

11261
24
28)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

PERFIL DE EXPRESION GENETICA DE CITOCINAS EN CULTIVO DE
FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON ESCLEROSIS GENERALIZADA
PROGRESIVA Y SU CORRELACION CON LA PRODUCCION
DE COLAGENA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(INMUNOLOGIA)

P R E S E N T A :

CAMILO SEBASTIAN } ZURITA SALINAS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JORGE ALCOCER VARELA

MEXICO D.F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO
BAJO LA DIRECCION DEL DR. JORGE ALCOCER VARELA
EN EL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA Y REUMATOLOGIA
DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN.

A Gonzalo Camilo

INDICE

I. ABREVIATURAS.....	5
II. RESUMEN.....	8
III. GENERALIDADES.....	10
El fibroblasto.....	12
Regulación de la función del fibroblasto.....	12
Proliferación de los fibroblastos.....	12
Quimiotaxis de los fibroblastos.....	14
La matriz extracelular.....	15
Síntesis de la matriz.....	16
Degradación de la matriz.....	18
La colágena.....	18
Control y regulación de la síntesis de colágena.....	20
Las citocinas.....	22
Interleucina-1.....	23
Interleucina-2.....	24
Interleucina-4.....	24
Interleucina-6.....	25
Interleucina-8.....	25
Interleucina-10.....	26
Interleucina-13.....	26
Factor de necrosis tumoral-alfa.....	27
Factor de crecimiento transformante-beta.....	27
Interferón gamma.....	28
Esclerosis generalizada progresiva (Esclerodermia).....	29

IV.	HIPOTESIS	38
V.	OBJETIVOS	39
VI.	MATERIALES Y METODOS	40
VII.	RESULTADOS	48
VIII.	DISCUSION	63
IX.	CONCLUSIONES	71
X.	BIBLIOGRAFIA	73
XI.	AGRADECIMIENTOS	91

I. ABREVIATURAS

ACA	Anticuerpos anti-centrómero
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
ANA	Anticuerpos antinucleares
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
bFGF	Factor básico del crecimiento de fibroblastos
[14C]	Carbono 14
°C	Grados centígrados
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
cpm	Cuentas por minuto
esp	Cantidad suficiente para
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGP	Esclerosis Generalizada Progresiva (Esclerodermia)
FCF	Factor de crecimiento de fibroblasto
FCE	Factor de crecimiento epidérmico
FEC	Factor estimulador de colonias
x g	Tantas veces la gravedad
GAG	Glucosaminoglicanos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias-granulocitos-monocitos
HLA	Antígeno leucocitario humano
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IFN- γ	Interferón-gamma
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
M	Moles
MCAF	Factor activador de colonias-macrófagos
MEC	Matriz extracelular
min-max	Mínimo-máximo
NF-1	Factor nuclear-1
RNP	Ribonucleoproteína
Pcte	Paciente
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PDC	Proteínas degradadas por colagenasa
PDGF	Factor del crecimiento derivado de plaquetas
PGE2	Prostaglandina E 2
PHA	Fitohemaglutinina
PNDC	Proteínas no degradadas por colagenasa
SBF	Suero bovino fetal
TCA	Acido tricloroacético
TGF- β	Factor transformador del crecimiento-beta
Th2	Linfocitos T ayudadores

TNF- α
TR

Factor de necrosis tumoral- α 1E α
Transcriptasa inversa

ABSTRACT

Systemic sclerosis is a connective tissue disease of unknown etiology in which fibroblast functions are altered, resulting in fibrosis of the skin and internal organs. The mechanisms of perpetuation of the local immune dysregulation and of fibroblast activation are not known. There is, however, evidence that cytokines may play an important role. Because of this, the spontaneous expression of cytokine genes was investigated in fibroblasts from patients with long-standing systemic sclerosis, and it was correlated with the production of collagen.

Fibroblasts were obtained from skin biopsies of nine patients diagnosed with systemic sclerosis (> 4 years disease duration), and of ten control subjects. The expression of cytokine genes was detected by polymerase chain reaction for interleukin-1 β , (IL), IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF- α , TGF- β , IFN- γ . In addition, collagen synthesis was measured by [14 C] proline uptake.

All fibroblasts of systemic sclerosis patients expressed spontaneously the IL-6 gene ($p=0.05$ compared with controls). Eight of the nine patients expressed IL-8 gene ($p<0.05$ compared with controls); four of them expressed the TGF- β gene; two expressed weakly the TNF- α gene. One patient expressed the IL-1 β gene. The expression of the other cytokines was not detected. Collagen production was greater in fibroblasts from patients with systemic sclerosis of long evolution ($p=0.028$) compared with controls. A correlation was found between the expression of IL-6 and IL-8 genes and collagen production ($r_s=1$).

The constitutive expression of IL-6, IL-8 genes by fibroblasts may play an important role in the perpetuation of the local immune dysregulation, as well as in the permanent activation of fibroblasts in lesions of systemic sclerosis.

II. RESUMEN.

La esclerosis generalizada es una enfermedad del tejido conjuntivo de etiología desconocida en la que las funciones del fibroblasto se encuentran alteradas, resultando en fibrosis de la piel y de órganos internos. Los mecanismos de perpetuación de la inmunoregulación local alterada y de la activación de los fibroblastos en la lesión esclerótica no se conocen. Hay evidencia de que las citocinas podrían tener un papel importante. Debido a esto se investigó la expresión espontánea de los genes de citocinas en fibroblastos de pacientes con esclerosis generalizada y se correlacionó con la producción de colágena.

Los fibroblastos se obtuvieron de biopsias de piel de nueve pacientes con diagnóstico de esclerosis generalizada de larga evolución (>4 años) y diez sujetos controles. La expresión de los genes de citocinas fue detectada mediante la reacción en cadena de polimerasa para la interleucina (IL) IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), factor transformador del crecimiento-beta (TGF- β) e interferón-gamma (IFN- γ). Además, se midió la síntesis de colágena mediante la incorporación de prolina [14 C].

Todos los fibroblastos de pacientes con esclerosis sistémica expresaron espontáneamente el gen de la IL-6. Ocho de los nueve pacientes expresaron el gen de la IL-8. La expresión de los genes de la IL-6 y de la IL-8 fue significativamente mayor comparada con los controles ($p=0.05$, $p<0,05$ respectivamente). Cuatro de los nueve

pacientes tuvieron expresión del gen del TGF- β ; 2 expresaron débilmente el gen del TNF- α . Un paciente expresó el gen de la IL-1 β . La expresión de los genes de las otras citocinas no fue detectada. La producción de colágena fue mayor en fibroblastos de pacientes con esclerosis sistémica de larga evolución ($p=0.028$) comparados con los controles. Hubo correlación entre la expresión de los genes de la IL-6 y de la IL-8 con la producción de colágena ($r_s=1$).

La expresión constitutiva de los genes de la IL-6, y de la IL-8 por los fibroblastos puede jugar un papel importante en la perpetuación de la regulación inmune local alterada y también en la activación permanente del fibroblasto en la lesión de pacientes con esclerosis generalizada.

III. GENERALIDADES

El fibroblasto

Los fibroblastos se derivan del mesénquima embrionario. El término fibroblasto es usado para describir a un grupo de células que incluyen a las del tejido conjuntivo, células que sintetizan proteínas y componentes de la matriz extracelular (MEC) (fibrocitos), células contráctiles (miofibroblastos) y ocasionalmente a las células fagocíticas en los tejidos (histiocitos); tienen morfología similar pero funciones diferentes (1). Durante la embriogénesis, los fibroblastos no sólo sintetizan la matriz extracelular, sino también determinan la estructura esquelética, la localización de las células musculares, las vías de las fibras nerviosas y la organización de la piel (2). Durante el crecimiento y maduración de los tejidos, los fibroblastos continúan la síntesis y mantenimiento de los componentes de la MEC. Estos componentes son constantemente degradados y remodelados por varias enzimas degradantes que también son producidas por los fibroblastos. Otras funciones del fibroblasto son moduladas por señales de la MEC, factores de crecimiento y citocinas.

Los fibroblastos juegan un papel central en el proceso de inflamación y reparación. Además, estas células son capaces de producir tanto factores de crecimiento como citocinas (ver Tabla 1).

TABLA 1

Algunas citocinas y factores que expresan o sintetizan los fibroblastos

Citocina o factor	Estímulo	Referencia
IL-1 α , IL-1 β	constitutivamente	3
Interleucina-6	constitutivamente, virus, IL-1 β , TNF- α PDGF, IFN- β	4, 5
Interleucina-8	constitutivamente, IL-1	6
Interferón- β	IL-1	6
MCAF	IL-1- β	7
Factor B	IL-1, TNF- α	8
C3	IL-1 β , TNF- α	8
Factor H	IL-1 β , TNF- α	8
GM-CSF	IL-1 β , TNF- α	9, 10
TGF- β	constitutivamente	11, 12
TGF- α	constitutivamente	12
IL-13	Mycoplasma spp.	13
PDGF	IL-1	12

Regulación de las funciones del fibroblasto:

Las citocinas mencionadas en la tabla 1, pueden actuar en forma reguladora autócrina. También es importante indicar que estos factores y citocinas pueden modular o regular una variedad de funciones de los fibroblastos y sus productos, incluyendo proliferación, quimiotaxis, síntesis de proteínas de la MEC (colágena, glicosaminoglicanos (GAG), fibronectina), síntesis de otras moléculas como prostaglandinas, moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), asimismo, participa en la degradación de la MEC mediante la secreción de enzimas proteolíticas como colagenasa y gelatinasa (14).

Proliferación del fibroblasto:

La regulación de la proliferación del fibroblasto *in vivo* involucra la interacción compleja de numerosos factores, que incluyen la tensión de oxígeno, temperatura, contacto célula-célula, célula-matriz, factores de crecimiento y citocinas (15). Además, las hormonas, como la insulina, glucocorticoides, la hormona de crecimiento y la somatostatina tienen efectos sobre la proliferación del fibroblasto, y a su vez en la síntesis de la MEC. Una variedad de productos de las células inmunes tienen efectos sobre la proliferación del fibroblasto, de entre ellos el más estudiada ha sido la interleucina-1 (IL-1). Esta citocina puede estimular la proliferación fibroblástica, tal efecto es mediado por diferentes vías de activación celular (16). La estimulación de la proliferación es debida en parte a la producción endógena del factor de crecimiento

derivado de plaquetas-AA (PDGF-AA) (17). Tanto la IL-1 alfa como beta estimulan la proliferación de fibroblastos, pero bajo ciertas condiciones son capaces de suprimirla (15). El efecto estimulador de IL-1 sobre la proliferación es máximo cuando se añade el PDGF exógeno. Bajo ciertas circunstancias, la IL-1 actúa como un factor de progresión y estimula en forma sostenida la síntesis del ADN, mientras que el PDGF actúa como un factor de competencia (15). El PDGF incrementa la expresión del receptor de IL-1. En contraste, la IL-1 (y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α)) suprimen la expresión de los receptores del PDGF- β en los fibroblastos (18).

Otra molécula implicada en el metabolismo de fibroblastos es el TNF- α , una citocina pleiotrópica con múltiples efectos sobre la biología del tejido conectivo. El TNF- α se une a dos receptores específicos (p55 y p75), pero solamente el receptor p55 está presente en los fibroblastos. Así, el TNF- α estimula directamente su proliferación (19), y puede actuar en forma sinérgica con el factor de crecimiento epidérmico (FCE) y con otros factores de crecimiento para estimular el crecimiento de los fibroblastos. Este sinergismo se incrementa con el aumento de los receptores del FCE (también el TNF- α aumenta la expresión de los receptores del FCE). Como un efecto inmediato, el TNF- α disminuye la unión de FCE hacia su receptor en los fibroblastos mediante fosforilación mediada por cinasas e inhibición del receptor de FCE, efecto también observado con la IL-1 (19). Tanto la IL-1 como el TNF- α pueden suprimir la proliferación de los fibroblastos. En el caso de la IL-1, esta supresión ocurre tanto en forma directa como indirecta; esta última mediante la

producción de prostaglandina E (PGE) endógena. Ambas citocinas estimulan la síntesis de PGE. La interacción entre estas dos citocinas sobre la proliferación del fibroblasto es por ello tan dinámica como compleja. A pesar de que, la IL-1 y el TNF- α parecen ser las citocinas principales que regulan el crecimiento, otras citocinas también modulan la proliferación. Se ha observado que concentraciones altas de la interleucina-4 (IL-4), del TNF y del PDGF son necesarias para producir proliferación (15,20), mientras que el factor transformador del crecimiento-beta (TGF- β) y el interferon-gamma (IFN- γ), bajo ciertas circunstancias, también son necesarios para la proliferación de los fibroblastos (19,21). Sin embargo, el IFN- γ bloquea el efecto mitogénico del PDGF, del EGF y del factor del crecimiento del fibroblasto (FCF). El TGF- β puede inhibir la proliferación del fibroblasto, bloqueando la transición de la fase Go/S en el ciclo celular.

Quimiotaxis de los fibroblastos:

La quimiotaxis de los fibroblastos es estimulada por una variedad de citocinas, que incluyen: el TGF- β , la IL-4, el TNF- γ , el PDGF y el TNF (15). Los productos de los monocitos no solamente inducen quimiotaxis de los fibroblastos, sino también estimulan la producción de factores quimiotácticos por el fibroblasto. Por el contrario, el TNF- α y la IL-1 estimulan al fibroblasto para la producción de un factor quimiotáctico para monocitos, además, los productos de los monocitos estimulan al fibroblasto para producir el factor quimiotáctico de neutrófilos (9,10).

La matriz extracelular:

La MEC es una estructura altamente compleja e importante del tejido conjuntivo. Está formada por diferentes componentes, que incluyen varios tipos de colágena, glicoproteínas tales como fibronectina, laminina y entactina/nidogen, glucosaminoglicanos y proteoglicanos (22). Cada uno de los componentes de la MEC se clasifica de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas y fisiológicas. Así, existen proteínas fibrosas de dos tipos funcionales: las estructurales, principalmente colágena y elastina; y las adhesivas como la fibronectina y la laminina. Ambas clases se encuentran en una variedad de tamaños y formas, que se derivan de la expresión de diferentes genes y constituyen familias de proteínas. En la piel, existe una gran variedad de moléculas de la matriz que son parte importante del espacio intercelular que se forma por medio de una red intrincada de macromoléculas, que incluyen varios tipos de colágenas. Las variaciones en su composición y la cantidad de estas macromoléculas y la manera cómo están organizadas, dan lugar a una diversidad de formas, cada una adaptada a los requerimientos particulares de cada tejido. La piel normal está compuesta de las colágenas fibrilares (colágenas tipo I, III y V); también la colágena tipo V está presente en la matriz vascular (23). Las proporciones de los diferentes tipos de colágenas extraídas de la dermis en piel adulta son del 80 al 90 % de colágena tipo I, del 8 al 12 % de la tipo III y menos del 5 % de la tipo V (24). La alta concentración de la colágena tipo I contribuye a la gran fuerza de tensión de la dermis y su resistencia a la deformación. La colágena tipo VI,

presente también en la dermis, está organizada en filamentos finos que se intercalan con las fibrillas de colágena, y su distribución tan variada, sugiere que tenga un papel en la organización de otros de los componentes de la MEC junto con la influencia del citoesqueleto de las células que la producen (25). En lo que respecta a las proteínas adhesivas, sólo mencionaremos que participan en la interacción de las células con la MEC y con otras células; la fibronectina promueve la interacción de los fibroblastos y otros tipos de células con la MEC del tejido conjuntivo, mientras que la laminina promueve la unión de las células epiteliales a la lámina basal (26). Las moléculas de GAG y proteoglicanos en el tejido conjuntivo, forman una sustancia fundamental hidratada, tipo gel, en la que se encuentran embebidas las proteínas fibrosas, de tal manera que este gel resiste las fuerzas compresivas en la MEC y las fibras de colágena principalmente proveen la fuerza tensil (26).

Síntesis de la matriz:

El papel de los productos inmunes en la regulación de la biosíntesis de la MEC en fibroblastos ha sido ampliamente estudiado, fundamentalmente en lo que se refiere a la regulación de la biosíntesis de la colágena. Los estudios iniciales han demostrado que las células inmunes liberan factores que pueden estimular o suprimir la síntesis de colágena (27,28). Muchos de estos factores han sido aislados, caracterizados y estudiados en forma purificada o como moléculas recombinantes. El TGF- β , las IL-1 alfa y beta y la IL-4 estimulan al fibroblasto para sintetizar colágena (21,29), mientras

que el IFN- γ y el TNF inhiben su síntesis, en ciertas condiciones (19,30). La IL-1 alfa y beta, el TGF- β y el TNF estimulan la síntesis de GAG, principalmente del ácido hialurónico (21,31). Mientras que la IL-4 estimula muy pobremente la síntesis del ácido hialurónico, pero se incrementa cuando se agrega la IL-1 alfa o beta a los cultivos de fibroblastos (21). La IL-1 alfa o beta y el TNF incrementan la síntesis de colagenasa (32,33), mientras que el TGF- β reduce la síntesis de colagenasa de los fibroblastos e inhibe a la IL-1 alfa, IL-1 beta y el TNF para la estimulación de la síntesis de colagenasa (21). Algunos mecanismos posibles podrían jugar un papel en la acumulación exagerada de colágena tipo I o de otros componentes de la MEC en las lesiones fibróticas observadas en algunos padecimientos: primero, el reclutamiento y la proliferación de fibroblastos estarían implicados en el incremento de componentes de la MEC; segundo, una secreción disminuída de colagenasas y otras proteasas extracelulares o un incremento de la secreción de inhibidores de estas proteasas (que podrían tener un efecto similar) y, finalmente, la estimulación de la síntesis de colágena tipo I y otros componentes de la MEC podrían también producir el mismo fenotipo (34). La inducción de la síntesis de colágena está regulada a nivel de ARNm, como se ha demostrado en estudios de hibridación *in situ* (35,36), y niveles altos de ARNm colágena tipo I han sido detectados principalmente en células fibroblásticas que se co-localizaban en los infiltrados perivasculares (37).

Por otro lado, la colágena tipo VII es un componente principal de las fibrillas de anclaje en la membrana basal del epitelio

escamoso de la piel, mucosas y córnea. Es sintetizada *in vitro* principalmente por queratinocitos, pero también puede secretarse por fibroblastos dérmicos y su síntesis puede verse incrementada por el TGF- β 1 y el TGF- β 2 (38). Rudnicka y colaboradores demostraron grandes cantidades de colágena tipo VII en la piel de pacientes con esclerodermia (tanto en epidermis como en la dermis) y en zonas ectópicas, acompañándose de la presencia de epítopes del TGF- β 1 y del TGF- β 2 (39).

Degradación de la matriz:

Las proteinasas que degradan a la MEC son producidas por varias células, incluyendo al fibroblasto y son de tres clases: (a) proteinasas de serina, (b) metaloproteinasas y (c) proteinasas de cisteína (catepsinas) (21). Como se mencionó, la IL-1 y el TNF- α estimulan ciertas enzimas para degradar la matriz, tal es el caso de la colagenasa, estromelisina, gelatinasa y otras metaloproteinasas. El TGF- β por su parte inhibe la producción de colagenasa (40), mientras que estimula la producción de gelatinasa (15,40).

La colágena

La colágena muy abundante en el organismo; pertenece a una familia de proteínas que se dispone en estructuras supramoleculares de la MEC conjuntamente con glucoproteínas no colagénicas, proteoglicanos, lamininas, fibronectinas, tromboespondinas, entactina y tenascina (41). La estructura común de las 19 tipos de colágenas conocidas actualmente es la triple hélice (procolágena), en la que

tres hélices levógiras (cadenas alfa) giran alrededor de sí mismas para formar una superhélice dextrógira. Cada cadena alfa tiene aproximadamente 1000 aminoácidos, en la que cada tercer residuo está ocupado por Gly. Cerca del 10 al 20% de cada uno de los otros residuos, X o Y, de la secuencia repetitiva [Gly-X-Y]_n, son prolina e hidroxiprolina, respectivamente, los residuos de hidroxiprolina son esenciales para formar los puentes de hidrógeno indispensables para la estabilidad de la hélice. Las colágenas pueden clasificarse en diferentes grupos en base a la estructura de sus genes y según los aminoácidos que los constituyen (42). La colágena tipo I es un heterodímero de 2 cadenas $\alpha 1(I)$ y una tercera con una secuencia de aminoácidos ligeramente diferente a la $\alpha 2(I)$. La colágena tipo I es sintetizada principalmente por osteoblastos y fibroblastos e interviene en diversas funciones biológicas: en fibrosis patológica, migración celular, entre otras. La colágena tipo III se describió originalmente en tejidos que también contienen colágena tipo I; forma fibrillas homotípicas [$\alpha 1(III)$], y puentes cruzados con la colágena tipo I. La colágena tipo III retiene dominio globular N-terminal en su estado procolágena. Existe en la piel, aorta y tendón. La colágena tipo VI forma una subclase particular dentro de la familia de las colágenas; está presente en cartílago y otros tejidos como piel, tendón, entre otros. Posee tres cadenas polipéptidicas $\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$, $\alpha 3(VI)$ en un heterodímero. La función de la colágena tipo VI no está bien definida, pero posee varias propiedades interactivas que sugieren que puede servir como molécula conectora entre las células y su MEC. La colágena tipo VII se expresa casi exclusivamente en la

zona de la membrana basal de epitelios escamosos estratificados de piel, membranas mucosas y córnea. Es el componente predominante de las estructuras de adhesión que aseguran la integridad de la membrana basal cutánea; es un homotrímero [$\alpha 1(VII)$], que contiene una región larga de triple hélice discontinua y un dominio no colagénico en el extremo amino de la cadena $\alpha 1(VII)$ (43).

Control y regulación de la síntesis de colágena:

Se han llevado a cabo numerosos estudios con fibroblastos cultivados de piel. La mayoría de estos estudios han demostrado un incremento de la colágena tipo I producida por los fibroblastos cultivados sin alteración de la relación $\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$ (44). La síntesis de colágena tipo III también es mayor en fibroblastos de EGP, al igual que la de las colágenas tipo VI y VII (39,45). Esto indica una regulación coordinada pero anormal en la expresión de los genes de tales 4 tipos de colágenas en esta enfermedad.

Los elementos regulatorios se localizan en el promotor, en la región 5' y en el primero y quinto intrón del gen de colágena tipo I [$\alpha 1(I)$] en humanos (44). La región 5' y los dos intrones parecen modular los rearrreglos de los elementos tanto positivos como negativos. Muchos factores transcripcionales interactúan con los elementos del promotor proximal, que incluyen factor nuclear-1 (NF-1), factor de unión a la caja <CCAAT>, Sp1 y dos factores inhibitorios adicionales. En el sitio de unión para la caja <CCAAT> se encuentran también dos sitios más para los otros dos factores que se unen al promotor de $\alpha 1(I)$. Estos tres sitios de unión son comunes

para los genes de $\alpha 2(1)$ (35). Asimismo, los elementos regulatorios del gen de colágena $\alpha 2(1)$ también se encuentran distribuidos en el inicio del sitio de la transcripción; el primer intrón parece poseer tanto los segmentos inhibitorios como regulatorios, pero la delineación precisa de estas secuencias no se ha sido establecida. Algunos elementos *cis acting* han sido identificados "rio arriba" del inicio de la transcripción; 4 secuencias *cis acting* diferentes pueden unirse a los factores nucleares presentes en extractos de fibroblastos. El mismo heterodímero puede unirse al *motif* CCAAT en el promotor de la cadena $\alpha 2(1)$ y unirse también al promotor de la cadena $\alpha 1(1)$; una mutación en la secuencia CCAAT disminuye fuertemente la transcripción. Ambos genes de la colágena contienen grupos de elementos regulatorios, en los cuales tres diferentes factores transcripcionales se unen: uno es activador transcripcional, mientras que los otros dos son inhibidores transcripcionales. Generalmente, estos factores participan en el control coordinado de estos dos genes, los que se coexpresan en casi todas las situaciones fisiológicas o patológicas (35). Recientemente se ha identificado un nuevo factor transcripcional: el c-Krox, en los genes de colágena tipo I, que se expresa preferentemente en la piel; este factor se une específicamente a los elementos ricos en guanina (46). La regulación de la expresión del gene $\alpha 3(VI)$ es diferente a los de $\alpha 1(VI)$ y $\alpha 2(VI)$. El gen de la colágena tipo VI no posee el elemento CCAAT, sin embargo, posee una secuencia de 100 pares de bases (pb) polipirimidínicas; y solamente un factor transcripcional SP1 se une a esta región (47). Se sabe que algunas citocinas pueden influir en

la expresión de estos genes, siendo la más estudiada el TGF- β : se ha demostrado que este factor aumenta la síntesis de algunos componentes de la MEC incluyendo colágena tipo I (35) ; este incremento es debido, en parte, a la estimulación de la transcripción de los genes correspondientes. La interacción del TGF- β con su receptor sobre la membrana del fibroblasto dispara las vías de señalización, lo que permite la activación de los factores nucleares, resultando en el incremento de la transcripción de la colágena $\alpha 2(I)$. También se ha demostrado que el TGF- β estimula el promotor del gen de la colágena. Recientemente se ha demostrado que el TGF- β estimula selectivamente la síntesis de colágena tipo I y la producción total de colágena bajo ciertas condiciones de cultivo, lo que mimetiza la situación *in vivo* (48). Otra citocina que afecta la síntesis de colágena tipo I a nivel transcripcional es la IL-1, que promueve al promotor CCAAT; mientras que el IFN- γ disminuye la síntesis de colágena tipo I tanto para $\alpha 1(I)$ como para $\alpha 2(I)$, disminuyendo la actividad de la región CCAAT.

Las citocinas:

Las citocinas son un grupo de polipéptidos de bajo peso molecular que modulan importantes funciones celulares. Estos factores solubles secretados por células del sistema inmune pueden modular la fibrosis o promover daño vascular (49,50,51). La IL-1, la IL-2, la IL-4, la IL-6, el TNF- α y el IFN- γ son citocinas que alteran varias actividades de los fibroblastos, tales como crecimiento (52), metabolismo (53), producción de los componentes de la MEC, producción de colagenasa o prostaglandinas y su actividad (52). Otros estudios

han sugerido la importancia de algunas citocinas, como la IL-6, IL-8, el TGF- β , en la patogénesis de los cambios fibróticos e inflamatorios (14,54). Los fibroblastos tienen receptor para la IL-4 y esta citocina juega un papel importante en la proliferación y producción de la MEC (49). Recientemente, se demostró que la IL-10 modula la expresión de colágena tipo I en fibroblastos humanos (55) y además, se demostró la expresión del ARNm de IL-13 en biopsias de glándula salival de pacientes con síndrome de Sjögren primario (56), sugiriendo su participación en la regulación *in situ* de la hiperactividad de los linfocitos B en los infiltrados leucocitarios de la glándula salival de estos pacientes. (Por lo que posiblemente también actúe sobre los linfocitos B, que se encuentran en algunos casos en los infiltrados celulares de pacientes con EGP). Otras factores como el PDGF, FGF, IGF-1, MCP-1, FGF y el NGF están también implicados en la activación o proliferación del fibroblasto (51,57).

La interleucina 1:

La IL-1 es producida por osteoblastos, monocitos, macrófagos, queratinocitos, células de Kupffer, células de la glía, hepatocitos, células del epitelio tímico, glándula salival y fibroblastos (58). Es una citocina que posee una amplia variedad de funciones biológicas, como la de estimular la proliferación de los fibroblastos humanos, la producción de GAG y de colágenas tipo I y III en cultivo, así como también la síntesis de colágena total (59). La IL-1 induce la producción de colagenasa en fibroblastos y células sinoviales. Los fibroblastos normales estimulados por la IL-1 también producen

citocinas, tales como la IL-1, la IL-6, la IL-8, el TNF- α , el PDGF y prostaglandinas (3). *In vitro*, la IL-1 incrementa la expresión de la molécula ICAM-1 y la adhesión de linfocitos (60), por lo que mediante estas vías, la IL-1 puede contribuir a los cambios tanto fibróticos como vasculares. La IL-1 β a una concentración de 1 ng/ml es más potente que la IL-6 en la inducción de la producción de colágena y GAG. Contrariamente, las IL-1 alfa y beta incrementan la síntesis de colagenasa por los fibroblastos (21).

Interleucina 2:

El papel de la IL-2 en la activación del linfocito T ha sido claramente documentada y su producción anormal puede ser responsable en parte de la patogénesis de enfermedades autoinmunes y síndromes inmunodeficientes (53,61). La IL-2 puede modular el metabolismo del tejido conjuntivo a través de efectos indirectos de otras citocinas producidas por células inmunes activadas por IL-2 (53).

Interleucina 4:

La IL-4 fue inicialmente caracterizada como un factor estimulador del linfocito B. Es una citocina pleiotrópica con múltiples funciones modulatorias sobre diferentes tipos de células, que incluyen linfocitos T, monocitos, macrófagos, fibroblastos, queratinocitos y células cebadas entre otras. Esta molécula es producida principalmente por linfocitos CD4⁺, Th0 y Th2, timocitos fetales, células cebadas, basófilos y linfocitos T CD8⁺ (62). Es capaz de estimular la síntesis de ADN por fibroblastos y también de

incrementar la síntesis de IL-6 por fibroblastos (14,60). Además, induce la quimiotaxis de los fibroblastos, junto con otras citocinas y factores de crecimiento. La IL-4 de manera dosis dependiente induce la proliferación de fibroblastos normales (60). También incrementa los niveles de ARNm de fibronectina (63).

Interleucina 6:

La IL-6 se purificó originalmente de los sobrenadantes de cultivos de linfocitos T, fibroblastos y células mononucleares de sangre periférica (4). Posee una amplia variedad de actividades que comparte con la IL-1 y el TNF- α . La IL-6 a una concentración de 1 μ g/ml estimula la síntesis de colágena y GAG (64). Se conoce que los fibroblastos cultivados producen constitutivamente la IL-6 y pueden ser inducibles por la IL-1 y el TNF- α (14). Otras citocinas, como la IL-1, el TNF- α , el PDGF y el IFN- β , pueden inducir en el fibroblasto la síntesis de IL-6. El incremento de la IL-6 puede ser importante en la fibrosis.

Interleucina 8:

La IL-8 pertenece al grupo de citocinas que muestran homología al péptido III y pertenece a la familia de las proteínas de membrana asociadas a lisosomas (51). Fue inicialmente purificada de células mononucleares y posteriormente caracterizada (65). Es producida por una variedad de células, tales como, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales. Es un potente quimiotáctico para

granulocitos y linfocitos T (66). Se desconoce el papel de la IL-8 en las enfermedades del tejido conjuntivo.

Interleucina 10:

La IL-10 es un polipéptido de 18.5 Kd, la cual fue originalmente caracterizada como una citocina producida por clones de linfocitos Th2 murinos (67). La interacción de la IL-10 con otras citocinas ha sido estudiada; por ejemplo, la IL-10 suprime la síntesis de la IL-1 alfa, de la IL-1 β , de la IL-6, de la IL-8, del TNF- α y del FSC-GM. Hay poca información sobre los efectos de IL-10 en las células del tejido conjuntivo. La IL-10 recombinante aumenta la expresión de los genes de colagenasa y estromelisina y disminuye la expresión del gen de la colágena tipo I en fibroblastos de piel adulta normal (55). La IL-10, al igual que otras citocinas como la IL-1, el TNF- α y el TGF- β , está probablemente implicada en la regulación tanto de la degradación como de la síntesis de colágena tipo I. Igual que de la IL-8 se conoce muy poco sobre sus posibles efectos en las enfermedades del tejido conjuntivo, así como también sobre las acciones en las células del mismo tejido.

Interleucina 13:

La IL-13 es una citocina secretada por linfocitos T activados, la cual es un potente modulador *in vitro* de varias funciones de los monocitos y linfocitos B (68). La IL-13 podría participar en la regulación *in situ* de la hiperactividad de los linfocitos B, dado que estos linfocitos se encuentran, en algunas ocasiones, en los

infiltrados celulares de los pacientes con EGP. Tampoco, se conoce el papel de la IL-13 en la células del tejido conjuntivo.

Factor de necrosis tumoral-alfa:

El TNF- α es generalmente referido como "citocina inflamatoria" junto con la IL-1 y la IL-6; la sobreproducción del TNF ha sido implicada en varias condiciones patológicas, que incluyen a las enfermedades autoinmunes. El TNF- α , bajo ciertas condiciones, inhibe selectivamente la síntesis de colágena (69). Otros estudios apoyan una acción inductora del TNF- α sobre la síntesis de colágena (24). El TNF- α estimula la síntesis de GAG, principalmente ácido hialurónico y también estimula de síntesis de colagenasa (31,33). Por otro lado, el TNF- α , en altas concentraciones, estimula el crecimiento de los fibroblastos (60,70). Estas funciones al parecer están reguladas o controladas por el receptor p55 del TNF- α observado sobre la membrana del fibroblasto, además de tener acciones quimiotácticas (23).

Factor transformador del crecimiento-beta:

El TGF- β es un péptido de 25 Kd que tiene efectos sobre el crecimiento y proliferación de las células. Definido originalmente por su capacidad de transformación fenotípica de células no neoplásicas en cultivo, posee muchas otras funciones tanto fisiológicas como patológicas. El TGF- β es producido por linfocitos, células endoteliales, plaquetas, macrófagos y fibroblastos (71). El TGF- β tiene muchas actividades biológicas; con pocas excepciones,

1

todas las células tienen receptores de superficie para el TGF- β . Se ha implicado como el principal factor en la fibrogénesis tanto normal como patológica. La naturaleza de la respuesta depende de una variedad de condiciones, incluyendo el tipo de célula, condiciones de crecimiento, el estado de diferenciación de la célula y presencia o ausencia de otros factores de crecimiento. Los efectos del TGF- β sobre la proliferación y diferenciación pueden ser estimulatorios o inhibitorios, dependiendo de las condiciones mencionadas. Además, tiene efecto quimiotáctico tanto en células inflamatorias como en fibroblastos. Es un potente mediador de la síntesis y depósito de la MEC, tanto de colágena como de fibronectina y GAG por fibroblastos (14,48,71,72), jugando un papel importante en la reparación y fibrosis (75). Este aumento de la síntesis de la MEC es el resultado de cuatro acciones diferentes de los TGF-betas; estimulan directamente la síntesis de la MEC, incrementan la síntesis de inhibidores de proteasas, incrementan la síntesis de integrinas (una familia de receptores heterodiméricos de membrana, que permiten el reconocimiento específico de las moléculas de la MEC con membranas basales o con otras células) y reducen la síntesis de proteasas (11). También participan en la quimiotaxis de los fibroblastos (21).

Interferón gamma:

El IFN- γ es producido por varios tipos de células, posee una variedad de actividades como antiviral, antiprotozoario e inmunomoduladoras. El IFN- γ puede inhibir selectivamente la síntesis de colágena y fibronectina en fibroblastos humanos (52,73) e

incrementar la síntesis de GAG (1). También puede actuar en forma sinérgica con la relaxina para disminuir la síntesis de la colágena (74). El IFN- γ puede modular la biosíntesis excesiva de colágena, sugiriendo que puede jugar un papel importante en la regulación de la fibrogénesis tanto normal como patológica (73). El IFN- γ , en dosis altas, inhibe la quimiotaxis de los fibroblastos (1).

Esclerosis Generalizada Progresiva (Esclerodermia).

La Esclerosis Generalizada Progresiva (Esclerodermia) es una enfermedad autoinmune, que se caracteriza por lesiones vasculares proliferativas, lesiones microvasculares obliterativas y atrofia residual con fibrosis de múltiples órganos (76).

La primera descripción detallada de esta enfermedad fue realizada en 1753 por Curzio. Posteriormente, Grintrag en 1847 introdujo el término esclerodermia (*skleros*, duro; *derma*, piel), con énfasis de que la piel es el órgano blanco más afectado (77); aunque en 1945 se llegó a un acuerdo general sobre la afección a múltiples órganos en esta enfermedad (78). Posteriormente, Klemperer la incluyó en lo que denominó como "Enfermedades de la Colágena". En los últimos años el interés acerca de su patogénesis va en aumento, sin haberse dilucidado completamente (79).

La patogénesis de la EGP se desconoce, sin embargo, se han implicado cuatro factores, a saber: 1.- La activación persistente de fibroblastos, que da como resultado la producción de cantidades excesivas de constituyentes de la MEC como colágena y otras proteínas que se acumulan en la dermis y en los órganos internos (52,79). 2.-

La existencia de disfunción vascular y microvascular, caracterizadas por la proliferación de la íntima y obliteración capilar (80,81). 3.- La existencia de anomalías autoinmunes, con producción de autoanticuerpos, hipergamma globulinemia e hiperactividad de linfocitos T (74,75); y 4.- Cambios proliferativos y activación de las células cebadas (82,83). Al parecer todos estos componentes están directamente relacionados, y su interacción funcional determina la extensión y la localización de la respuesta fibrótica (37).

Está bien establecido el papel principal que tiene el fibroblasto en la producción excesiva de la síntesis de colágena. Algunos estudios han sugerido que los fibroblastos de pacientes con EGP producen mayor cantidad de GAG y fibronectina (84) que los fibroblastos de sujetos normales (85,86). Otros autores no han encontrado diferencias (87,88), por lo que el papel de estos componentes, junto con la osteonectina está aún por dilucidarse. También se ha determinado una disminución en la secreción de collagenasa y de otras proteasas extracelulares que podrían permitir un aumento de las proteínas de la MEC (35), así como el aumento de prolil 4-hidroxilasa, una enzima importante en el ensamble de procolágena estable (89). La acumulación de colágena en tejidos afectados por la EGP se origina principalmente de la sobreproducción de colágena por fibroblastos residentes en el estroma. Por otro lado, investigaciones realizadas en monocapa de cultivo de fibroblastos obtenidos de pacientes con la EGP han demostrado aumento en la síntesis de colágena (45,90). Además, se ha observado un incremento en la producción de procolágena en fibroblastos de estos pacientes,

asociado con niveles elevados de sus correspondientes ARNm, lo que sugiere un control pretranscripcional alterado (23). Además la inducción de la síntesis de colágena tipo I está regulada a nivel de ARNm, como se ha demostrado por estudios de hibridación *in situ* (37). También por este método, Peltonen y colaboradores (91) describieron la expresión aumentada de colágena tipo I en fibroblastos de dermis de pacientes con EGP, sobre todo en la capa papilar superior y en la dermis profunda. De igual forma, se ha demostrado que los fibroblastos de piel de 5 pacientes con EGP (2 con morfeas generalizadas) contenían híbridos de ARNm con ADNc radiomarcado en la cadena pro α 1(I). La distribución de los fibroblastos que hibridaron no fue homogénea. En las biopsias de pacientes con EGP, se observó expresión alta de colágena tipo I en fibroblastos dispersos difusamente por la dermis, aunque era más abundante en las capas subepidérmicas y en la dermis profunda. En otros estudios se ha encontrado que la piel de pacientes con esclerodermia expresa genes de colágena que codifican para la colágena tipo I, III, VI y VII (39,92,93).

Peltonen y colaboradores (92) demostraron numerosos fibroblastos con híbridos de ADNc y de ARNm de α 2(VI), expresados en la dermis papilar y en la reticular; contrariamente, la piel normal de individuos sanos tenían poca expresión del ARNm de α 2(VI). La distribución de fibroblastos con hibridación positiva para colágena tipo VI en la dermis de esos pacientes no fue homogénea, lo que sugiere que sólo algunas subpoblaciones de fibroblastos de la piel afectada muestran fenotipo activado. Por medio de experimentos de transcriptasa reversa

(TR) y reacción en cadena de polimerasa (PCR), con el ARN total de cultivos de fibroblastos de piel de 7 pacientes con EGP, se encontró aproximadamente 3.4 veces más ARNm de colágena tipo VII en los pacientes que en los controles sanos (39). La inmunofluorescencia indirecta de la piel de individuos sanos, al usar un anticuerpo monoclonal anti-colágena VII, mostró esta colágena en la unión dermo-epidérmica y en la membrana basal. En piel, se detectó por inmunofluorescencia en la membrana basal y por toda la dermis en 6 de 8 pacientes. En dos casos hubo tinción intensa en la dermis reticular; en otros dos pacientes se observó en la epidermis y en uno, en el tejido subcutáneo.

La biosíntesis de la colágena está regulada por algunas citocinas y factores de crecimiento del fibroblasto, que tienen un efecto mitogénico sobre éste y aumentan la expresión del ARNm de la colágena y de otras proteínas de la MEC (23). Todos estos mecanismos podrían jugar un papel en la acumulación exagerada de los componentes de la MEC observada en las lesiones fibróticas de estos pacientes.

La regulación inmune alterada en la esclerodermia incluye hiperactividad de linfocitos T, aumento de infiltrado celular, especialmente de mononucleares en la dermis de lesiones tempranas, interacción del fibroblasto con la células mononucleares (94,95,96), y la presencia de autoanticuerpos como los anticuerpos antinucleares (ANA). Por ello se ha sugerido que la inmunidad celular y humoral juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. Cerca del 95% de los pacientes con esclerodermia tienen un autoanticuerpo identificable (76), pero ha sido muy difícil demostrar que algún

autoanticuerpo sea responsable de los cambios patogénicos observados en esta enfermedad (34). También autoanticuerpos anti-células endoteliales de isotipo IgG se han observado en esta enfermedad (97). Muchos de los autoanticuerpos no activan la cascada del complemento y los niveles de los componentes del complemento en el suero son normales; los complejos inmunes y el complemento no se depositan alrededor de los vasos (50). Además, la pérdida de correlación de los títulos de anticuerpos con la duración de la enfermedad o actividad es compatible con la ausencia del papel patogénico de estos anticuerpos (50). Si los autoanticuerpos contribuyeran a la patología en la esclerodermia sería promoviendo la fagocitosis, por citotoxicidad dependiente de anticuerpos, o por activación de células que expresan autoantígenos sobre su superficie; posiblemente, los anticuerpos pueden entrar a los compartimentos intracelulares y mediar eventos intranucleares (50). Por otro lado, existe una heterogeneidad restringida de los tipos de autoanticuerpos que se encuentran en cada paciente (31,32). En el suero de estos pacientes se han identificado varios autoanticuerpos, que incluyen: anti-topoisomerasa I (Scl-70) (un autoanticuerpo dirigido contra la DNA-polimerasa), anti-centrómero (ACA), anti-RNA polimerasa I, anti-U1-RNP (anti-U1-ribonucleoproteína), anti-U3-RNP (anti-fibrillarina) y otros menos frecuentes como: anti-trimetil-guanosina, anti-U11, anti-7-2 RNP y anti-Ku (76,98). Estos autoanticuerpos se han correlacionado con la enfermedad, así como con la extensión de la lesión, la afección a órganos internos, algunas manifestaciones de la enfermedad y también con el pronóstico de la misma. Entre el 20

y el 75 % de los pacientes con EGP poseen anticuerpos Scl-70 (32), que se relacionan con una progresión cutánea rápida y escasez de telangiectasias y con afección gastrointestinal, pulmonar, neurológica y cardíaca (99,100). Los anticuerpos anti-centrómero se encuentran en pacientes con el Síndrome de CREST (Calcinosis, Fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, telangiectasias y esclerodactilia), su frecuencia va del 70 al 80 % (33,101) y se relacionan con curso benigno, con baja incidencia de daño renal y pulmonar, así como también una mayor supervivencia (102). Los anticuerpos anti-fibrilarina se encuentran presentes en pacientes con afección cutánea y telangiectasias diseminadas (103). También se han encontrado diferentes porcentajes de anticuerpos anti-centrómero y anti-topoisomerasa en varios grupos étnicos; así, los ACA están presentes en blancos y no son observados en negros americanos, mientras que los anti-topoisomerasa están aumentados en negros americanos y mexicanos (98). Se han reportado también anticuerpos contra eritrocitos (6%), granulocitos (18 %), plaquetas (24 al 75 %) (50) y contra ciertas citocinas, como la IL-6 (17 %) y la IL-8 (54,66,104), pero su papel patogénico no está del todo claro.

Por otro lado, el fondo genético juega un papel importante, o por lo menos puede ser un cofactor potencial por cuanto se ha considerado susceptibilidad genética conferida por los determinantes del CMH; algunos grupos de investigadores han demostrado una asociación de las diferentes subpoblaciones de pacientes con EGP con el CMH (105,106). Así, Luderschmidt y colaboradores encontraron correlación de HLA-DR5 con todas las formas de EGP (107).

Recientemente, se ha informado asociación de HLA-DR5 (DRB1*1104) y HLA-DRw52 en pacientes mexicanos con EGP (108). También se ha reportado que la segunda región hipervariable del HLA-DQB1 puede ser un candidato para el epítoto asociado con la respuesta de autoanticuerpos, específicamente con anticuerpos anti-centrómero (109). Pero se conocen pocos casos de EGP familiar y no se han encontrado marcadores genéticos comunes en tales familias (106). Por otro lado, se han propuesto factores ambientales, como los agentes químicos que estarían implicados en la patogénesis de la EGP (110).

La red de citocinas juega un papel potencial en los procesos de fibrosis de los tejidos, esta posibilidad ha sido demostrada en estudios *in vitro* donde se ha observado que varias citocinas son capaces de regular la expresión de los genes de la colágena en cultivos de fibroblastos (66). En observaciones *in vivo* se ha demostrado que las citocinas participan en el desarrollo de fibrosis, dado que en el suero de estos pacientes se observan elevados niveles de algunas citocinas, incluyendo la IL-2, IL-4, IL-6 y la IL-8 (5,49,66,111). Estos factores solubles secretados por las células del sistema inmune pueden modular la fibrosis o promover el daño vascular en la EGP, o modular las propiedades de las células endoteliales, incluyendo proliferación, expresión de moléculas de adhesión, adhesión a linfocitos T o neutrófilos y la producción de otras citocinas (49,112,113). Los linfocitos de sangre periférica de pacientes con EGP producen cantidades aumentadas de IL-2 cuando son incubados con colágena tipo I (14). Además, los niveles de IL-2 en

suero se han correlacionado con el grado de progresión de la enfermedad (111).

La IL-6 se encuentra elevada en sangre periférica de pacientes con EGP comparados con los controles (50). Los monocitos obtenidos de lavado bronquial de pacientes con EGP producen más IL-6 que los controles, tanto los no estimulados como los estimulados con lipopolisacárido. A pesar de estos hallazgos, los monocitos de sangre periférica tuvieron una producción normal, tanto los estimulados como los no estimulados (50). Ciertas citocinas como la IL-1 β , el TNF- α , el IFN- γ , la IL-2 influyen en el metabolismo *in vitro* del fibroblasto (53). Tanto la IL-1 β como el TNF-alfa incrementan la producción de colágena en los fibroblastos (70), mientras que el IFN- γ disminuye la síntesis de colágena de fibroblastos de pacientes con EGP (73). La IL-4 y el TGF- β aumentan la expresión del ARNm de fibronectina en fibroblastos de pacientes con EGP (63,114). Alcocer-Varela y colaboradores demostraron que la estimulación con fitohemaglutinina (PHA) de los linfocitos de pacientes con EGP producían IL-2 en cantidades iguales o superiores a los controles (115). También, el mismo grupo reportó la producción espontánea de la IL-1 por parte de monocitos de sangre periférica de pacientes con EGP no tratados (116,117).

Por otro lado la presencia de la IL-2 en sueros de pacientes con EGP apoya el papel de la activación de los linfocitos T en esta enfermedad; además de la asociación entre los niveles del suero y la progresión de la enfermedad indicando que la activación de los linfocitos T puede participar en la progresión de esta enfermedad

(111,118). Posteriormente, Whiteside y colaboradores demostraron que los sobrenadantes de células mononucleares tienen efectos estimulatorios sobre la síntesis de GAG en fibroblastos dérmicos en cultivo, este efecto podría estar mediado por la IL-1 (119). La acción de la IL-1 sobre los fibroblastos normales induce la producción de algunas citocinas y factores de crecimiento como la IL-1, la IL-6, la IL-8, el TNF- α , el CSF, el PDGF y prostaglandinas (3). Mientras que los fibroblastos de pacientes con EGP producen espontáneamente niveles elevados del receptor de la IL-1 y proteínas inducibles de la IL-1, como son la IL-6 y la PGE2, comparados con fibroblastos normales en condiciones libres de suero bovino fetal (SBF) (3).

Por todos los antecedentes mencionados el papel del fibroblasto, tanto en la producción de citocinas como en su regulación local, no está del todo aclarado. Por lo que son necesarias nuevas investigaciones en este campo. La relación de la producción de colágena por los fibroblastos con algunas citocinas es conocida, pero es importante establecer si las citocinas producidas por los fibroblastos estarían induciendo la síntesis de colágena en forma local. En nuestro trabajo nos propusimos estudiar la expresión de los genes de diferentes citocinas que inducirían al fibroblasto a la producción de colágena, así como de aquellas implicadas en la patogenia de la esclerosis generalizada.

IV. HIPOTESIS:

El perfil de expresión de genes de citocinas de fibroblastos de pacientes con EGP de larga evolución (> de 4 años de duración) es diferente al de los sujetos controles y se correlaciona con la producción de colágena.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL:

1.- Definir el perfil de la expresión espontánea de genes de citocinas producidas por fibroblastos de pacientes con EGP en fase tardía y correlacionarlo con la producción de colágena.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1.- Identificar la expresión de citocinas implicadas en la fase tardía de la enfermedad y compararlas con las encontradas en el grupo control.

2.- Estudiar los niveles de síntesis de colágena producidos por los fibroblastos de pacientes con EGP y compararlos con los observados en el grupo control.

3.- Establecer la participación de citocinas en la generación y perpetuación de la matriz extracelular (colágena) característica de esta enfermedad.

VI. MATERIALES Y METODOS

PACIENTES:

Se estudiaron nueve pacientes diagnosticados de EGP quienes tenían los criterios de clasificación para esta enfermedad (120). Seis de estos pacientes tenían EGP y tres tenían síndrome de CREST. Además se estudiaron diez sujetos controles, personal sano del laboratorio (siete) o pacientes quirúrgicos (dos cirugía abdominal y una cirugía mamaria). Ningún paciente tenía síndrome de sobreposición u otras enfermedades del tejido conjuntivo ni enfermedades de la piel. Ningún control padecía enfermedad autoinmune, del tejido conjuntivo o de la piel. Aunque los pacientes no fueron pareados con el grupo control, las características socio-demográficas fueron similares. Uno de los pacientes recibió antiinflamatorios no esteroideos, tres recibieron D-penicilamina, uno recibió prednisona en dosis inferior a 7.5 mg, dos cisapride, dos colchicina, tres vasodilatadores periféricos, dos drogas bloqueadoras H2 y un paciente no recibió ningún medicamento. Todos los pacientes recibieron información completa del propósito del estudio, y firmaron su consentimiento para su participación.

CARACTERISTICAS CLINICAS:

Los pacientes fueron evaluados para la presencia de daño o afectación pulmonar, gastrointestinal, renal, cardíaco o muscular, así como también para la pérdida digital. También se evaluaron anticuerpos antinucleares, anti-topoisomerasa I, anti-centrómero,

También factor reumatoideo y se midieron los niveles de inmunoglobulinas. La afectación pulmonar fue evaluada por la presencia de fibrosis bibasal en una radiografía de tórax o por restricción de la capacidad funcional pulmonar determinada por espirometría o por pruebas funcionales. La hipertensión pulmonar fue evaluada por ecografía bidimensional. El daño gastrointestinal fue determinado basado en síntomas o hallazgos endoscópicos compatibles con reflujo esofágico o diarrea crónica con malabsorción no debido a otra patología o, alternativamente con anomalías en la motilidad determinadas por radiografía o hallazgos manométricos o por saculaciones colónicas. La patología renal fue considerada cuando los pacientes presentaban hipertensión maligna o reducción en la depuración de la creatinina inferior a 80 ml/min o los valores de la creatinina sérica superior a 2 mg/dl. El daño cardíaco fue definido por pericarditis, arritmia o defectos en la conducción en ausencia de enfermedades coronarias conocidas. La miositis fue definida por mialgias o debilidad asociada con el incremento de los valores en suero de creatinín-cinasa o aldolasa y con los hallazgos compatibles en la biopsia de músculo o electromiografía.

Los ANA y los ACA se determinaron por inmunofluorescencia indirecta. Los anti-Scl-70 se determinaron por ELISA. Las inmunoglobulinas y el factor reumatoide se cuantificaron por nefelometría.

BIOPSIA DE PIEL:

Los fibroblastos dérmicos fueron obtenidos por biopsia mediante un sacabocados de 4 milímetros de diámetro tanto para los pacientes

como el grupo control; previo lavado de la región con solución salina estéril y alcohol, se anestesió con 0.5 a 1 ml de xilocaína al 1%. En los pacientes las biopsias se obtuvieron en una zona de piel afectada. El material de la biopsia fue cortado en fragmentos pequeños (12 a 15 fragmentos de una biopsia de 4 mm) y colocados en cuatro o cinco frascos de cultivo de 25 cm² (Falcon Labware, USA). Posterior a una incubación de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente, que tiene la finalidad de evitar que el medio de cultivo despegue los fragmentos de tejido, se añadieron 3 ml de medio de cultivo (medio esencial mínimo-Dulbecco modificado (D-MEM), suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), L-glutamina al 2 mM, kanamicina (0.1 mg/ml), gentamicina (0.05 mg/ml) y anfotericina B (0.25 µg/ml) y se colocó en una estufa a 37 °C en 5% de CO₂, 95% de aire, en condiciones de humedad. El medio de cultivo se cambió cada 7 días en las tres primeras semanas, para luego cambiar cada 3 a 4 días durante 3 a 5 semanas. Después de este período, cada explante tenía en su alrededor los fibroblastos. Cuando los fibroblastos llegaron a confluencia se despegaron con tripsina-EDTA (0.5 µg/ml de tripsina 1/250 y 0.2 µg/ml de EDTA en solución salina amortiguada) (GIBCO BRL) durante 1 a 2 min a 37 °C. La tripsina fue neutralizada con medio de cultivo D-MEM suplementado. Los fibroblastos se lavaron por una ocasión y fueron resuspendidos en 5 o 6 ml de D-MEM, siendo repartidos en dos o tres cajas de cultivo, dependiendo del número celular y nuevamente colocados en incubación. Este procedimiento de subcultivo fue realizado rutinariamente hasta el subcultivo 5. Durante estos subcultivos se congeló una muestra, cuando el número

celular lo permitía. Todos los experimentos fueron realizados entre los subcultivos segundo al quinto. El número de células en cada subcultivo fue de 6 a 10 millones, éstas fueron congeladas en tubos de polipropileno a -70°C hasta su uso.

DETECCION DEL ARNm DE CITOCINAS MEDIANTE TRANSCRIPTASA INVERSA-REACCION EN CADENA DE POLIMERASA (TR-RCP):

El ARN fue extraído de 6 a 10 millones de fibroblastos mediante RNazol (Biotech Laboratories, Houston, TX, USA). El ARN fue tratado con 10 unidades de ADNasa I (GIBCO-BRL, USA) a 37°C por 30 min; posteriormente se extrajo con fenol, cloroformo/alcohol isomálico (21/1 volumen/volumen), finalmente precipitado con etanol. LA TR-PCR fue realizada usando $2\ \mu\text{g}$ de ARN. El ARN fue primero tratado con 50 U de transcriptasa inversa del virus de leucemia murina Moloney en presencia de $2.5\ \mu\text{M}$ de oligo (dT)₁₂₋₁₈ y cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatados. Se realizó un ciclo de 57°C por 60 min; y 72°C por 5 min. Para la amplificación del RCP de los productos del ADNc se añadieron 30 pM del iniciador sentido, 30 pM del iniciador antisentido y 2 U de Taq polimerasa (GIBCO-BRL) a la mezcla de reacción. Cada ciclo de amplificación fue de 94°C por 1 minuto; 55°C por 1 min y 72°C por 1 min por 33 ciclos. Posterior a los 33 ciclos los productos fueron corridos en electroforesis en agarosa al 1%. Los geles fueron fotografiados usando una película Polaroid tipo 665. Se estimó la intensidad de las bandas mediante densitometria utilizando los negativos de las fotos; todos los valores fueron normalizados con el control positivo de la β -actina al que

arbitrariamente se le dio el valor de uno. Todas las muestras fueron incluidas para el ARNm de β -actina usando los mismos productos. El control negativo se incluyó en cada muestra. Los iniciadores para la IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF- α , TGF- β , INF- γ y también para la β -actina se encuentran en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de los iniciadores para la PCR.			
RNAm	Iniciador sentido (5')	Antisentido (3')	Tamaño del producto (pb)
IL-1 β	5'GGATATGGAGCAACAAGTGG 3'	5'ATGGYACCACTTGGGGAACTG 3'	263
IL-2	5'GTCACAAAACAGTGCACCTAC 3'	5'ATGGTTGCTGTCATCAGC 3'	352
IL-4	5'TGCCTCCAAGAACACAACCTG 3'	5'AACCTACTCTGGTTGGCTTTC 3'	324
IL-6	5'TCAATCAGGAGACTTGCCTG 3'	5'GATGACTTGTGATGTCCTGC 3'	268
IL-8	5'TTGGCAGCCTTCCTGATTTG 3'	5'AACCTCTCCACAACCCTCTG 3'	247
IL-10	5'ATCAAGGCCCATGTGAACTG 3'	5'AGAGCGCCAGATCCGATTTT 3'	295
IL-13	5'GAGTGTGTTTGTCCACCTTG 3'	5'TACTCGTTGGCTGAGAGCTG 3'	253
TNF- α	5'ACAAGCCTTTPAGCCCATGTT 3'	5'AAAGTAGACCTGCCCAGACT 3'	427
TGF- β	5'TTTCGCCCTTAGCGCCCACTG 3'	5'TCCAGCCGAGGTCTCTGCGG 3'	227
INF- γ	5'GCAGAGCCAAATTGTCCTCT 3'	5'ATGCTCTTCGACCTCGAAAC 3'	290
β -actin	5'GGTTCAGAACGATTCCTATG 3'	5'GCTTCTAAACATGATCTGGG 3'	257

**MICROENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE LA SINTESIS DE COLAGENA
(Incorporación de L[U-14C]-prolina):**

La cuantificación de la incorporación de prolina se realizó mediante la técnica de Diegelmann (121), con ligeras modificaciones. Brevemente, los fibroblastos se sembraron en placas de 24 pozos (2 cm²/pozo) con 5×10^4 células/cm² en 0,5 ml de D-MEM con 10% de SBF por 48 horas a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de aire, en condiciones de humedad. Posteriormente se eliminó el medio y se agregaron 500 µl de D-MEM con 2% de SBF y ácido ascórbico (50 µg/ml), se incubó por 3 horas, en las condiciones antes anotadas. Para la incorporación de prolina [U-¹⁴C] (250 µCi/5 ml), Amersham, UK) se agregaron 50 µg/ml de ácido ascórbico y 1 µCi de prolina [¹⁴C] por pozo y se incubaron por 18 horas. Las células se sonicaron por 20 segundos al 40% de potencia de un sonicador (Sonic dismembrator, modelo 50, Fisher Scientific, USA). Del extracto de fibroblastos obtenido se alicuotaron 100 µl para la cuantificación del ADN. El resto se precipitó con ácido tricloroacético (TCA) y L-prolina a una concentración final de 10% y 1mM, respectivamente. Se lavó por tres ocasiones con TCA 5%, L-prolina 1 mM. Posteriormente se precipitó con etanol:éter (1:1). El botón se resuspendió con amortiguador de HEPES 0.2 M, CaCl₂ 0.5 mM, N-etilmaleimida (NEM) 2.5 mM, pH 7.2, se añadieron 10 µl de colagenasa tipo VII de *Clostridium histolyticum* (0.98 U/µl) (SIGMA, USA) y se incubó por 90 min a 35 °C. Después de la incubación se precipitó con TCA a una concentración final del 10% y L-prolina 1 mM y se centrifugó a 13,600 x g por 10 min. Se tomaron 50 µl del sobrenadante y se colocaron en un vial para determinación

de radioactividad. El resto del sobrenadante se eliminó y el extracto celular se resuspendió en 500 μ l de TCA 5% y L-prolina 1mM. Se volvió a centrifugar a 13,000 g por 10 minutos. Se tomaron 50 μ l del sobrenadante mezclándolo con los anteriores, esto corresponde a proteínas degradadas por colagenasa (PDC). Las cuentas por minuto de radioactividad fueron medidas en un contador de centelleo modelo LS 1801 (Beckam, USA). El extracto celular se resuspendió en 500 μ l de un amortiguador de Tris 0.1 M, dodecil sulfato de sodio 0.5%, ditiotreititol 5 mM, pH 7.4; se tomaron 100 μ l. Se mezclaron con el líquido de centelleo (líquido de Bray: Naftaleno 60 g, PPO 4g, Metanol 100 ml, etilenglicol 20 ml, dioxano csp 1000 ml), se determinaron las cuentas por minuto. El resultado corresponde a las proteínas no degradadas por colagenasa (PNDC). Las cuentas por minuto para PDC y PNDC fueron corregidas a los volúmenes totales y se calcularon por medio de la ecuación de Diegelmann-Peterkofsky (122) para conocer la cantidad relativa de colágena y ésta se normalizó con la cantidad de ADN de los fibroblastos.

Ecuación de Diegelmann-Peterkofsky:

$$\text{PORCENTAJE RELATIVO DE COLAGENA: } \frac{\text{PDC}}{(\text{PNDC} \times 5.4) + (\text{PDC})} \times 100$$

CUANTIFICACION DEL ADN:

Del extracto de fibroblastos se obtuvieron 100 μ l para la cuantificación del ADN, como describe Labarca (123). A estos 100 μ l se les agregaron 3.9 ml de amortiguador de muestra (Na_2PO_4 0.05 M, NaCl 2.0 M, 0.4 μ g del reactivo de Hoechst 33288, pH 7.4). Además, se preparó un blanco de reactivo y contra éste se leyó en un fluorómetro (Perkin Elmer, USA) a 360 nm de excitación y a 460 nm de emisión. Se realizó una curva de calibración con estándares de ADN para determinar la cantidad de ADN existente en cada muestra.

ANALISIS ESTADISTICO:

Se realizó estadística descriptiva calculando promedio, desviación estándar o mediana e intervalos mínimo-máximo. Para la comparación intergrupala se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Para estudiar la asociación de variables se utilizó la prueba de correlación de Spearman. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$ (2 colas).

VII. RESULTADOS

CARACTERISTICAS DE LOS PACIENTES:

Las características demográficas de los pacientes y controles fueron similares (tabla 3). Todos los pacientes fueron mestizos, con edad promedio de: 44.5 ± 13 años, (mín-max 17-57 años), relación F/M: 8/1. Los controles también fueron mestizos, con edad ($X \pm DE$, mín-max) 27 ± 7.31 , 16-45 años, sexo F/M: 9/1. En todos los pacientes habían transcurrido más de 4 años desde la aparición del síntoma inicial o de haberse detectado fenómeno de Raynaud. La duración de la enfermedad fue de ($X \pm DE$) 15.9 ± 9.78 años, con límites de 4 a 26 años.

CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES:

De acuerdo a la valoración clínica y de gabinete, se evaluó la afección de órganos internos. Todos los pacientes tuvieron por lo menos un órgano afectado (cinco tuvieron daño esofágico, cuatro gastrointestinal, tres pulmonar y uno de cada uno como daño muscular, renal o pérdida digital por oclusión vascular). Ocho pacientes tuvieron al menos un autoanticuerpo presente. Un sólo paciente (JMS) presentó las tres clases de autoanticuerpos investigados (ANA, ACA, anti-Scl-70). Las características clínicas y de laboratorio de los enfermos estudiados se presentan en la tabla 4.

TABLA 3. DATOS DEMOGRAFICOS DEL GRUPO ESTUDIADO

CODIGO PCTE.	EDAD/SEXO	DURACION (a)	DIAGNOSTICO	CODIGO CONTROL	EDAD/SEXO	DIAGNOS.
JMH	55/F	26	CREST	YJH	26/F	NORM
PRM	17/F	4	CREST	MDE	16/F	NORM
ANN	37/F	25	CREST	MEZ	25/F	NORM
VIR	45/F	8	EGP	GDM	23/F	NORM
MDSR	39/F	25.8	EGP	AMM	27/F	NORM
EMS	52/F	12.2	EGP	FNV	29/F	NORM
JRNL	38/M	22.2	EGP	T	45/M	CIR P
SEPG	50/F	12	EGP	IRP	29/F	NORM
JMS	56/F	8	EGP	GVEH	25/F	CIR M
				NGE	25/F	CIR A
X ₁ DS	44.5±13	15.9±8.78				27±7.3
LIMITE	(17-57)	(4-26)				(16-45)
SEXO	90% F					88.8% F

F=femenino, M=masculino, a=años, EGP=esclerosis sistémica, NORM=normal, CIR P=pancreatitis, CIR M= cirugía de mama, CIR A=cirugía abdominal, X₁DS=Promedio de desviación estandar.

TABLA 4. DATOS CLINICOS Y DE LABORATORIO DE PACIENTES

CODIGO PCTE.	ORGANO IN- VOLUCRADO	VALORES DE LABORATORIO				
		HG	ANA	ACA	SCL-70	FR
JMI	ESOFAGO	SI	-	+	-	+
PRM	P, PD	No	-	-	-	-
ANM	GI	No	-	+	-	+
VIR	ESOFAGO	No	-	-	+	-
NDSR	GI, P	SI	+	-	+	+
EMS	GI, ESOFAGO	No	-	-	+	+
JRNL	ESOFAGO	SI	+	+	-	+
SEPG	GI, P, R	No	+	-	-	+
JMS	ESOFAGO, M	No	+	+	+	+

HG=hipergammaglobulinemia, ANA=anticuerpos antinucleares, ACA= anticuerpos anticentrómero, scl-70=anti-topoisomerasa I, FR=factor reumatoide, P=pulmonar, PD=pérdida digital, GI=gastrointestinal, R=renal, M=muscular

EXPRESION ESPONTANEA DE GENES DE CITOCINAS:

La expresión espontánea de los genes de la IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF- α , TGF- β y del IFN- γ por los fibroblastos fueron evaluados por la técnica de TR-RCP. Este análisis fue realizado en los nueve pacientes y los 10 sujetos controles.

La expresión del gen de β -actina fue observada en todas las muestras analizadas. El perfil de expresión de los genes de citocinas de dos pacientes representativos se muestran en las figuras 1 y 2, tanto los productos del PCR en gel al 1% de agarosa, como la densitometría del negativo de la foto. De igual forma, en la figura 3 se representa el perfil de la expresión de los genes de las citocinas y la densitometría del negativo de la foto que corresponde a un sujeto control. Los nueve pacientes expresaron el gen de la IL-8, mientras que 8 pacientes expresaron el de la IL-6. La expresión de los genes de estas dos citocinas (la IL-6 y la IL-8) en pacientes con EGP fue significativamente mayor ($p=0.05$, $p<0.05$ respectivamente) comparados con los sujetos controles. En contraste, el perfil de expresión de las citocinas de los sujetos controles tendió a ser bajo. Dos pacientes expresaron el gen del TNF- α , aunque su expresión fue baja (en la figura 2 se muestra el perfil de citocinas de JMH). Cuatro pacientes expresaron el gen del TGF- β , pero el grado de expresión de este gen fue similar en los sujetos controles (que también se detectó en cuatro de ellos). En la figura 4 muestra el perfil de expresión de los dos grupos estudiados. La expresión de los

otros genes de citocinas estudiados no pudo detectarse con los métodos empleados.

SINTESIS DE COLAGENA POR LOS FIBROBLASTOS:

Se determinó el porcentaje relativo de producción de colágena mediante la incorporación de L-prolina [¹⁴C] en tres pacientes y en cuatro sujetos controles. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los valores del porcentaje relativo de producción de colágena en los pacientes con esclerodermia estuvieron entre 4.79 a 7.2 (Md 5.98); mientras que los controles estuvieron entre 2.89 a 4.5 (Md 4.31). Los datos de los porcentajes relativos de la producción de colágena en pacientes y controles se representan en la figura 5. Los pacientes con EGP tuvieron significativamente mayor porcentaje relativo de producción de colágena por los fibroblastos al compararlos con los sujetos controles ($p=0.028$), como muestra la figura 6. Todos los fibroblastos de pacientes con EGP tuvieron una producción aumentada de la colágena en comparación a los controles. El promedio de producción de colágena por los fibroblastos de pacientes fue un 67.6 % mayor que el promedio de los controles.

CORRELACION DE LA EXPRESION DE GENES DE CITOCINAS CON LA PRODUCCION DE COLAGENA:

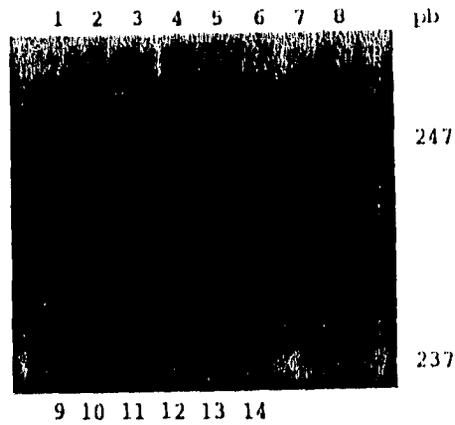
A fin de precisar si la síntesis de los fibroblastos de pacientes con esclerodermia responde a un patrón de activación

celular determinado se correlaciono la expresión de los genes de las citocinas con el porcentaje relativo de producción de colágena. Se encontró correlación significativa de la expresión de los genes de la IL-6 y de la IL-8 con el porcentaje relativo de producción de colágena ($r_s=1$ para ambas citocinas). Para las demás expresiones de los genes de citocinas no se encontró correlación. En las Tablas 5 y 6 se muestran los valores en unidades arbitrarias de la expresión de las citocinas y el porcentaje relativo de la producción de colágena de pacientes con EGP y de los sujetos controles, respectivamente.

CUANTIFICACION DEL ADN EN FIBROBLASTOS:

Se determinó la cantidad de ADN total de los fibroblastos, después de 18 horas de cultivo. La comparación entre ambos grupos se realizó entre subcultivos con número similar de pases (tercero al quinto). La cuantificación del ADN total de los pacientes fue (Md, min-max) 4.7, 4.25-5.25 $\mu\text{g}/\text{total}$; mientras que los controles fue (Md min-max) 4.55, 4.31-4.55 $\mu\text{g}/\text{total}$ ($p=0.314$, figura 7). Este ensayo permite demostrar que, ha vista de que la proliferación de fibroblastos fue similar en ambos grupos, la comparación en los porcentajes relativos de la producción de colágena es válido y responde a cantides disímiles de células obtenidas de los cultivos.

A



B

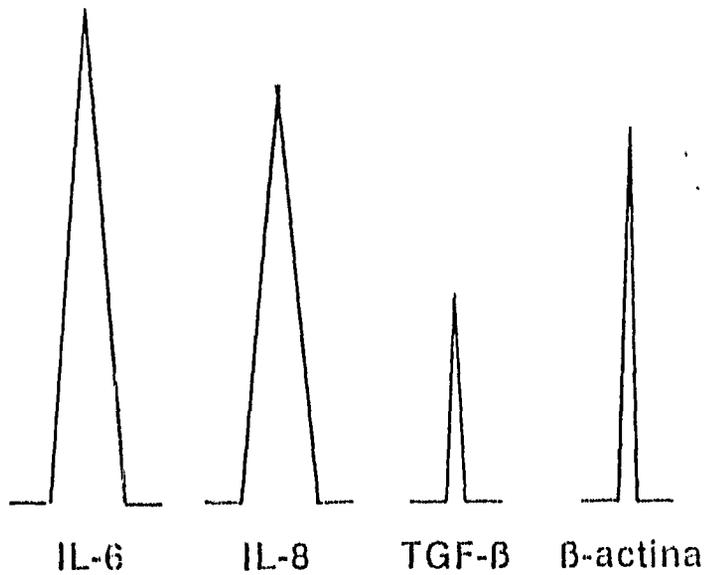
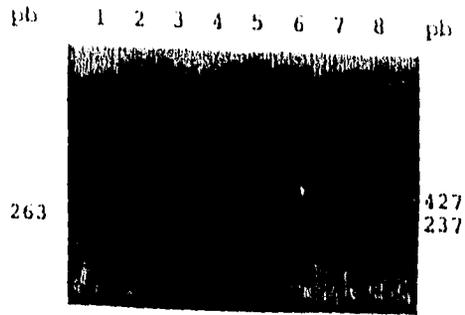


Figura 1. Expresión del perfil de citocinas por fibroblastos de un paciente con EGP (JRNL). La TR-RCP fue utilizada para amplificar el ARNm que codifica a las citocinas de los fibroblastos. A.- Perfil de expresión de citocinas. Carriles del 1 al 8: α -174 ADN digerido por Hae III, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, respectivamente. Carriles 9 al 14: TGF- α , TGF- β , IFN- γ , β -actina, control negativo, respectivamente. B.- La densitometría del negativo de la foto del gel.

A



B

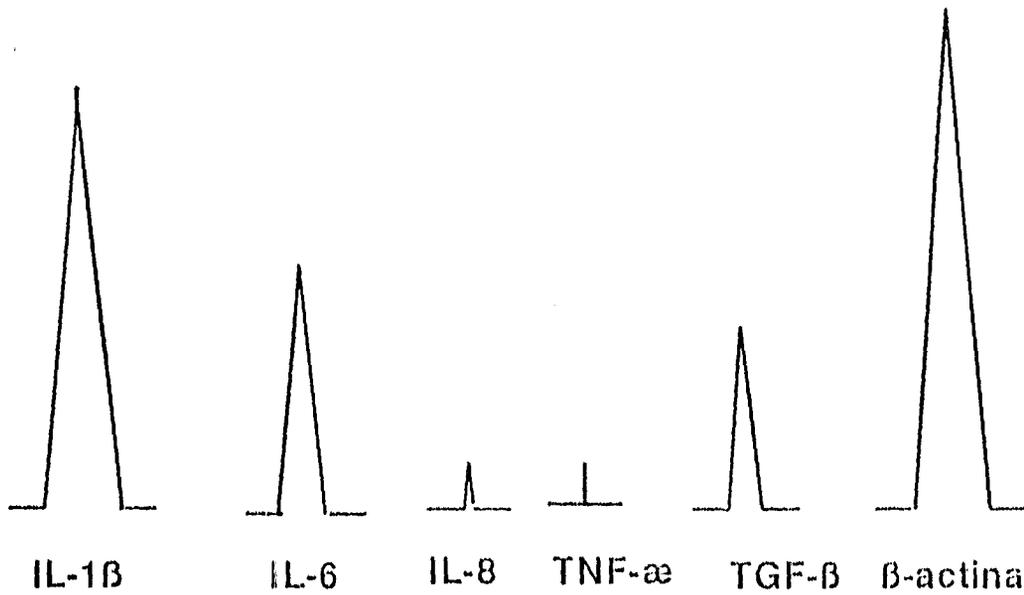
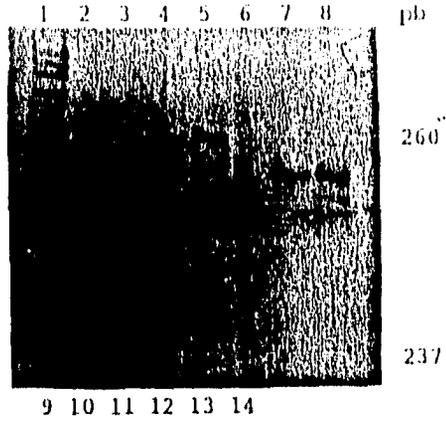


Figura 2. Expresión del perfil de citocinas por fibroblastos de un paciente con CREST (JMH). La TR-RCP fue utilizada para amplificar el ARNm que codifica a las citocinas de los fibroblastos. A.- Perfil de expresión de citocinas. Carriles 1 al 8: ox-174 ADN digerido con Hae III, IL-1 β , control negativo, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β , β -actina. B.- La densitometría del negativo de la foto del gel.

A



B

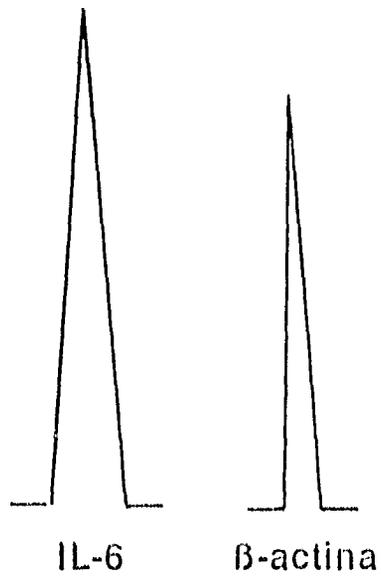


Figura 3. Expresión del perfil de citocinas por fibroblastos de un sujeto control (IRP). La TR-RCP fue utilizada para amplificar el ARNm que codifica a las citocinas por los fibroblastos. A.- Perfil de expresión de las citocinas. Carriles 1 al 8: α X-174 ADN digerido por Hae III, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, respectivamente. Carriles 9 al 14: TRF- α , TGF- β , IFN- γ , β -actina, control negativo, respectivamente. B.- La densitometría del negativo de la foto del gel.

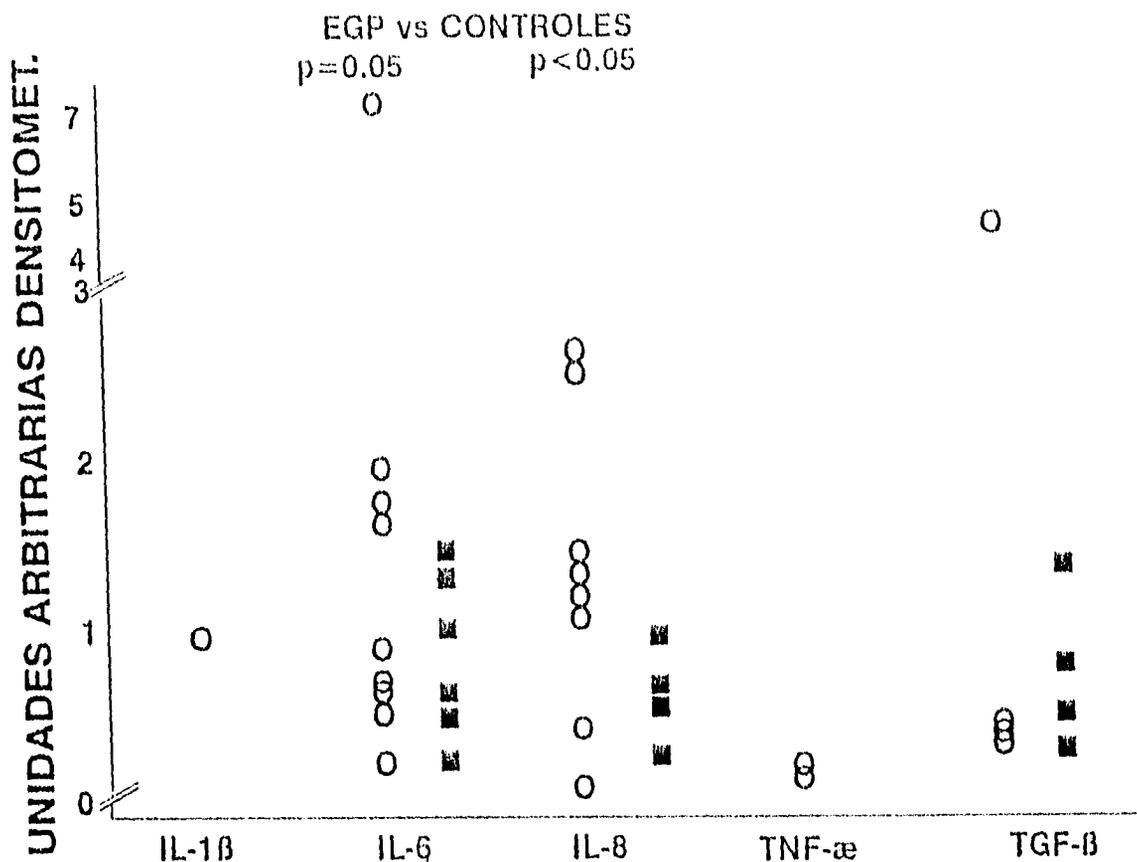
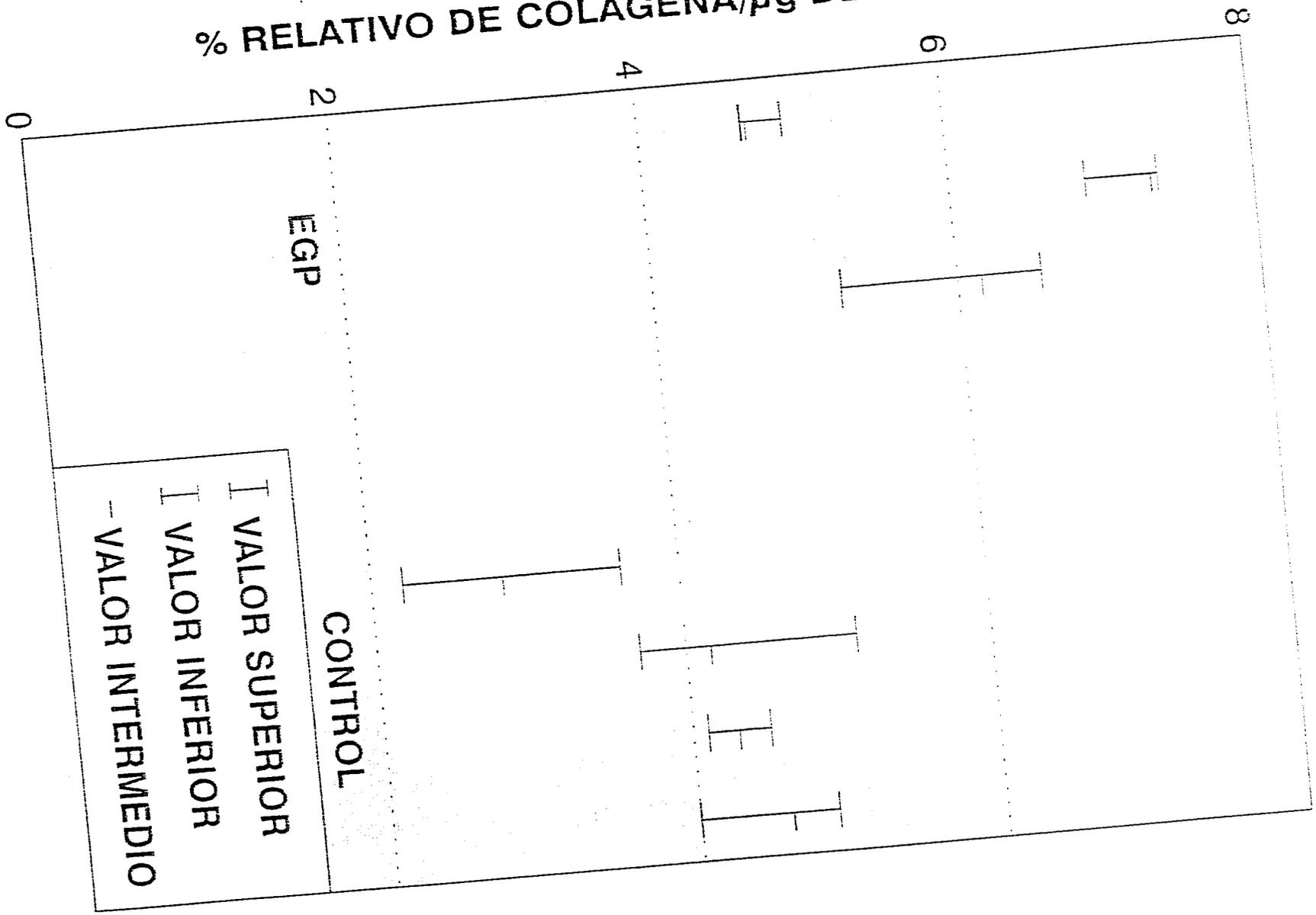


Figura 4. Semicuantificación de la expresión de genes de citocinas en fibroblastos de pacientes con EGP (o) y sujetos controles (■). La expresión del ARNm de la citocinas fue semicuantificada por amplificación del RCP del ADNc derivado del ARNm. Todos los valores fueron cuantificados en relación al control β -actina incluida en cada determinación del RCP. Un total de 9 pacientes con EGP y 10 sujetos controles fueron analizados. No aparecen las muestras negativas.

% RELATIVO DE COLAGENA/ μ g DE ADN



CONTROL

I VALOR SUPERIOR
I VALOR INFERIOR
- VALOR INTERMEDIO

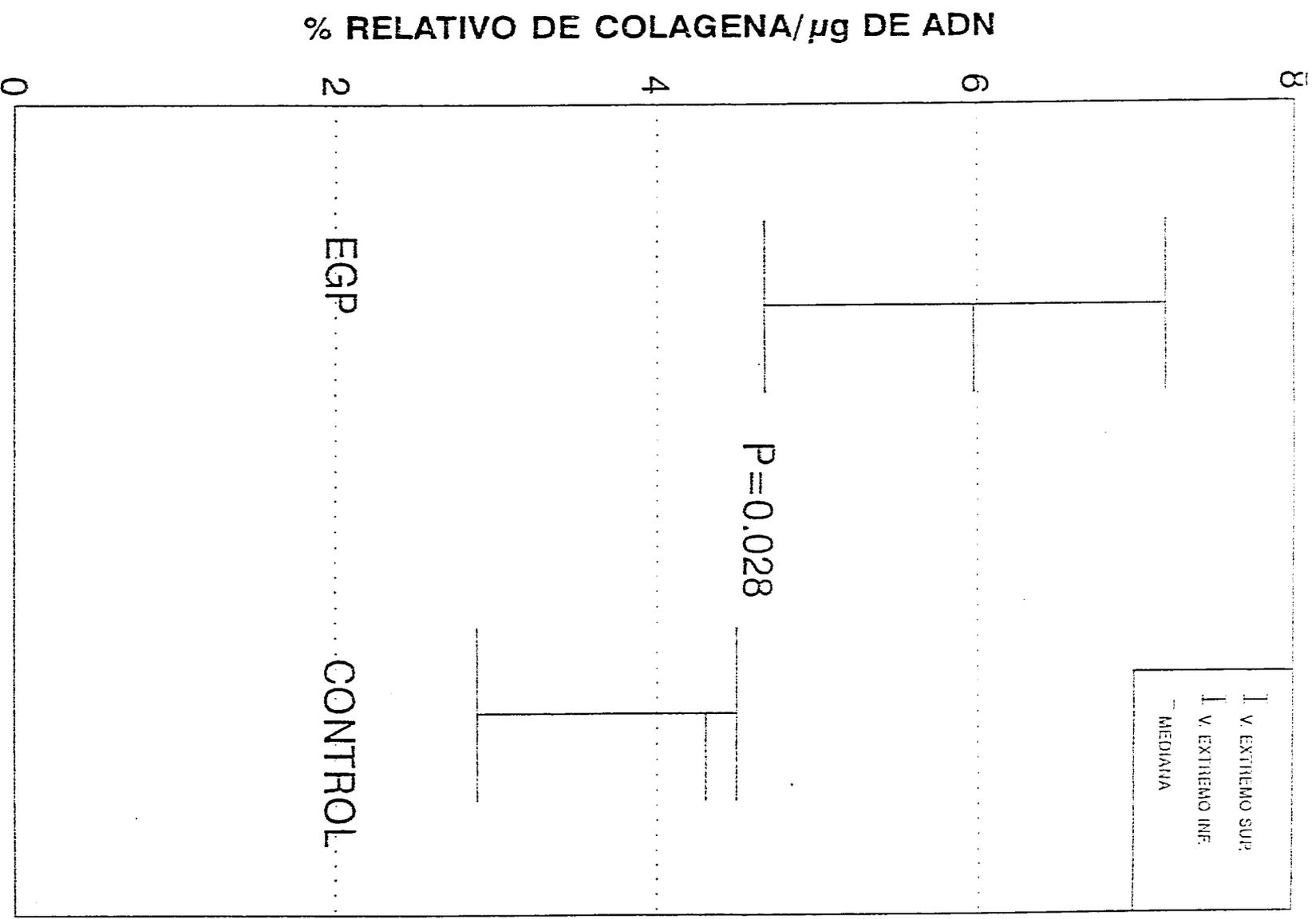


TABLA 5. EXPRESION ESPONTANEA DE GENES DE CITOCINAS Y SINTESIS DE COLAGENA
 POR FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON ESCLEROSIS SISTEMICA

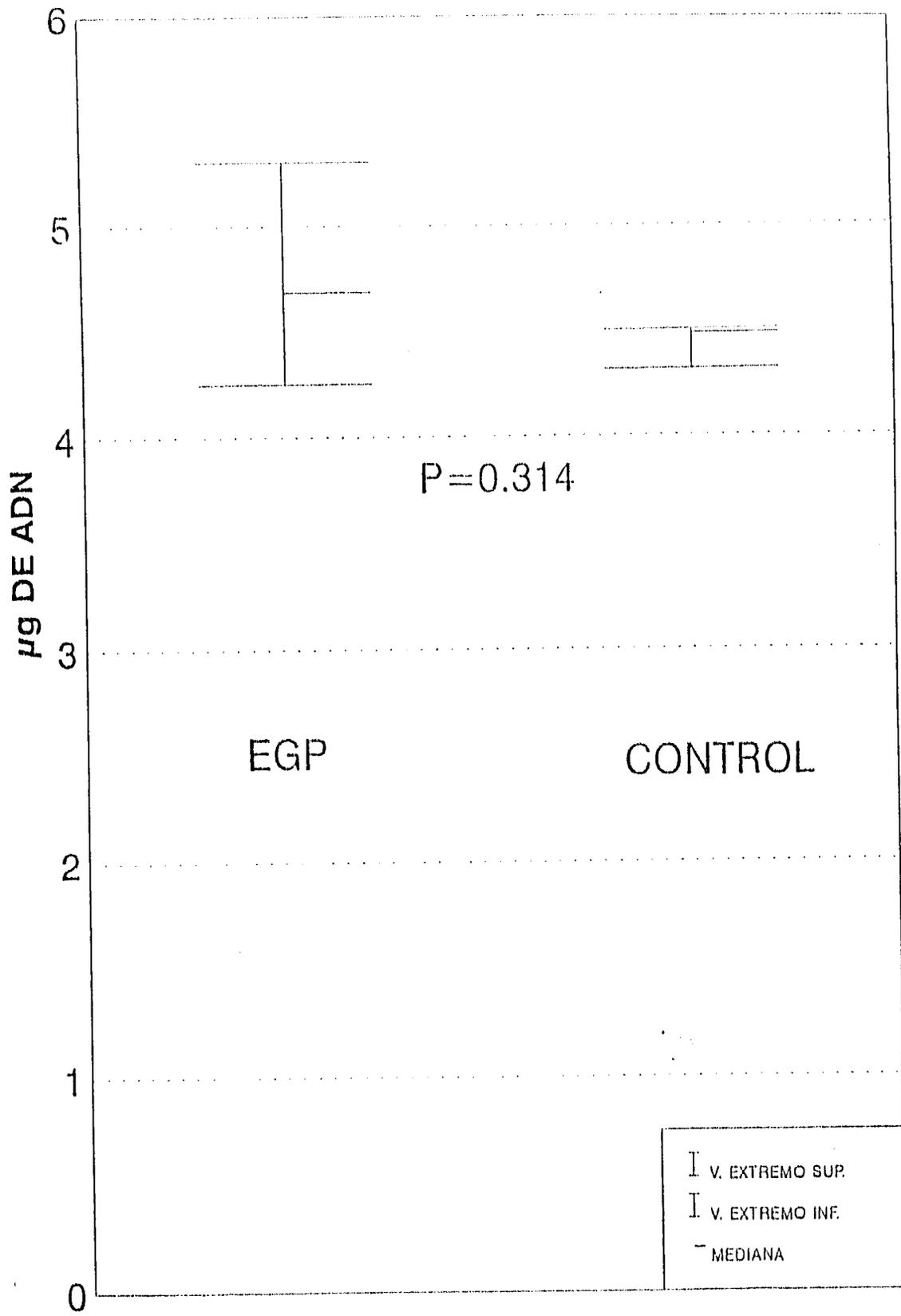
PACIENTE	IL-1 β	IL-6 \oplus	IL-8 \S	TNF- α	TGF- β	%CLG
JMI	0.85	0.7	0.07	0.16	0.44	ND
PRM	0	2.4	1.3	0.24	0	5.98
ANN	0	0.51	2.51	0	0	ND
VIR	0	0.43	0.93	0	0	ND
MDSR	0	7.06	2.88	0	4.36	7.2
EMS	0	0.53	1.21	0	0	ND
JRNL	0	1.83	1.14	0	0.22	4.67
SEPG	0	1.79	0	0	0	ND
JMS	0	0.28	0.15	0	0.18	ND

\oplus p=0.05, \S p<0.05, comparados con el grupo control, %CLG=porcentaje de síntesis de colágena, ND=no determinado.

TABLA 6. EXPRESION ESPONTANEA DE GENES DE CITOCINAS Y SINTESIS DE COLAGENA
 POR FIBROBLASTOS DE SUJETOS CONTROLES

CONTROL	IL-1B	IL-6	IL-8	TNF- α	TGF- β	%CLG
YLH	0	0	0.45	0	0	4.32
MDE	0	0.78	0.42	0	0.08	ND
MEZ	0	0.15	0.44	0	1.54	4.3
GDM	0	1.09	0.53	0	0.82	ND
AMM	0	0	0	0	0	2.89
PNV	0	1.3	0.75	0	0.26	4.5
T	0	0.25	0	0	0	ND
IRP	0	1.38	0	0	0	ND
HEVG	0	0	0	0	0	ND
EGN	0	0	0	0	0	ND

%CLG= Porcentaje de síntesis de colágeno, ND=no determinado.



VIII. DISCUSION

Los procesos que inducen fibrosis en la piel y/o en los órganos internos en pacientes con EGP son desconocidos. La estimulación del sistema inmune parece ser parte de este proceso. Se ha reportado que una clase peculiar de moléculas, las citocinas, son capaces de modificar varias funciones intrínsecas del fibroblasto y con ello contribuir a las alteraciones en la fibrogénesis propias de esta enfermedad. Las citocinas implicadas hasta la fecha son: la IL-1 β , IL-4, IL-6, TGF- β , TNF- α y el IFN- γ , algunas producidas por el mismo fibroblasto. Además, la contribución del fibroblasto y de otras células en la proliferación de la MEC, para explicar los fenómenos fibrosantes ha sido foco de mucho interés e investigación. En varios estudios, se ha observado que no siempre hay una buena correlación entre el número de células inflamatorias presentes en los tejidos de los pacientes con EGP y el grado de fibrosis (114). En la actualidad, se desconocen aún los procesos que perpetúan la fibrosis en algunos pacientes, y se especula que los fibroblastos producen constantemente citocinas proinflamatorias y quimioatrayentes que mantienen la reacción inflamatoria o fibrótica y así perpetúan un trastorno de la regulación inmune.

En el presente estudio se demostró que los fibroblastos de pacientes con EGP de larga evolución, por sí mismos, son capaces de expresar los genes de la IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α y del TGF- β . Además, se demostró una expresión aumentada del gen de la IL-6 en los

fibroblastos de pacientes con EGP de larga evolución comparados con los sujetos controles ($p=0.05$).

La IL-6 es un factor soluble secretado por las células del sistema inmune y del mesénquima, producida principalmente por linfocitos, queratinocitos y fibroblastos y metabolizada por fibroblastos de la piel (4). Feghali y colaboradores (5), mediante bioensayo y radioinmunoensayo, demostraron que los fibroblastos obtenidos de piel afectada de pacientes con EGP producen constitutivamente gran cantidad de IL-6; en tanto, la IL-6 no se encontraba elevada en el suero de esos pacientes. Estos autores indican que los fibroblastos cultivados de la lesión de pacientes con EGP están fisiológicamente activados por estímulos exógenos *in vivo*. Así, continúan produciendo en los cultivos, sin estimulación, grandes cantidades de IL-6. Ellos sugieren que los fibroblastos en pacientes con EGP pueden permanecer activados en la lesión, manteniendo la producción de la IL-6 y perpetuando sus efectos locales. En contraste, Bruns y colaboradores (124), mediante ELISA, no detectaron un incremento en la producción de la IL-6 en cultivo de fibroblastos de pacientes con EGP comparados con los sujetos normales. La diferencia de estos dos trabajos posiblemente se deba a la diferente sensibilidad de la metodología utilizada. La sobreexpresión constitutiva de la IL-6, en ausencia de estímulo exógeno, puede representar una característica intrínseca de fibroblastos de pacientes con EGP, que quizá influye en el curso de la enfermedad. Además, la habilidad de los fibroblastos de producir la IL-6 puede explicar los mecanismos de activación policlonal de los linfocitos

B y la hipergammaglobulinemia observada frecuentemente en estos pacientes. La producción aumentada de la IL-6 puede también estar relacionada con la activación generalizada de los linfocitos T y con la activación previa del fibroblasto por acción autócrina *in vivo*. En este sentido, Duncan y colaboradores (125) demostraron la producción de colágena por fibroblastos normales estimulados con IL-6 recombinante.

A la luz de nuestros hallazgos es posible que la IL-6 sea la citocina que induzca la síntesis de colágena en forma autócrina por parte de fibroblastos de pacientes con EGP de larga evolución.

En lo que respecta a la IL-8, ésta es una citocina producida por una variedad de células, tales como los fibroblastos, células epiteliales y endoteliales (67). Koch y colaboradores (126) demostraron la expresión elevada de la IL-8 en el endotelio de pacientes con EGP. Por otro lado, Silver (127) observó un incremento de la IL-8 en el lavado bronquial de pacientes con EGP. Especula que los fibroblastos del pulmón estarían contribuyendo a la producción aumentada.

Por nuestra parte, demostramos que la expresión del gen de la IL-8 por los fibroblastos de pacientes con EGP es significativamente mayor ($p < 0.05$) que en los sujetos controles. Es posible que la IL-8 este actuando como un factor quimiotáctico para los mismos fibroblastos y otras células y que contribuya así al mantenimiento de la respuesta inflamatoria y fibrótica en la lesión. Por otro lado, la IL-8 podría estar involucrada en los mecanismos de adhesión

celular, favoreciendo la presencia de linfocitos T y otras células en el foco de lesión.

Por ello es razonable proponer que esta citocina, junto con la IL-6, están implicadas en el mantenimiento de la activación, progresión y fibrosis observados en esta patología.

En el presente trabajo demostramos que los fibroblastos de dos pacientes con EGP expresan niveles bajos del TNF- α . Esto podría contribuir en forma autócrina a la síntesis de proteínas de la MEC (31) y como el TNF- α está implicado en la migración y quimiotaxis de los mismos fibroblastos y de otras células, estaría manteniendo la alteración de la regulación del sistema inmune que se observa en esta enfermedad. Estos resultados deben ser confirmados debido a la expresión baja de este factor y a los datos contradictorios atribuidos al TNF- α . Así, la evidencia se dirige a que el TNF- α disminuye la producción de colágenas tipo I y III e incrementa la producción de colagenasa (21,33,128,129), pero también hay reportes que indican que contribuiría a la producción de proteínas de la MEC (21). Koch y colaboradores (126), demostraron mediante inmunohistoquímica, que la reactividad del TNF- α fue más intensa en el estrato granuloso de pacientes con EGP que en los controles. Por otro lado, Silver (127) demostró que el TNF- α , junto con otras citocinas proinflamatorias, se encontraba elevado en el fluido del lavado bronquial de pacientes con EGP; esto indicaría que los fibroblastos residentes en el pulmón con el fenotipo y actividad biológica alterados, podrían contribuir a los niveles elevados de estas citocinas.

El TGF- β es un importante estímulo para la transcripción de ciertos genes de la MEC, particularmente colágena y fibronectina. El TGF- β ha sido implicado en la generación de la patología de la piel y de fibrosis en los órganos internos observadas en la EGP (39,130,131). Además, se conoce que las células inflamatorias, las cuales se han demostrado en grandes cantidades en las lesiones tempranas de la enfermedad, pueden liberar el TGF- β hacia su microambiente. A pesar de estas evidencias circunstanciales, la búsqueda del ARNm del TGF- β en biopsias de pacientes con EGP, o bien de la proteína madura, han mostrado resultados inconsistentes. Peltonen y colaboradores (91), mediante hibridación *in situ*, no encontraron elevación en el ARNm de TGF- β en biopsias de cinco pacientes con EGP de corta evolución (< 1 año). Higley y colaboradores (36) demostraron que los pacientes con esclerodermia cutánea difusa activa tenían mínimas cantidades del TGF- β y cantidades significativas de procolágena tipo I en biopsias de piel. Vuorio y colaboradores (86) reportaron que los niveles de ARNm de TGF- β 1 en piel afectada de pacientes con EGP se encontraban disminuidos. Needleman y colaboradores (90) demostraron por primera vez que los fibroblastos humanos, por sí mismos son capaces de producir TGF- β , pero no encontraron diferencias entre las cantidades producidas por los fibroblastos normales y los fibroblastos de EGP. McWhirter y colaboradores (132), mediante bioensayo, encontraron que los fibroblastos de pacientes con EGP no se caracterizaban por la síntesis elevada del TGF- β . En contraste, Gruschitz y colaboradores (133) encontraron niveles elevados de ARNm e inmunoreactividad del

TGF- β 1 y del TGF- β 2 en los focos inflamatorios perivascularés, así como también en la epidermis y queratinocitos foliculares de biopsias de pacientes con EGP de corta evolución. Kulozik y colaboradores (110) también encontraron niveles elevados de ARNm de TGF- β , así como también de procolágena tipo I en las proximidades de los infiltrados inflamatorios de biopsias de piel de EGP, mediante hibridación *in situ*. Sfrikakis y colaboradores (95) reportaron que el TGF- β se expresaba intensamente en la matriz extracelular de biopsias de piel afectada obtenidas de pacientes con EGP. Además, el TGF- β puede estar implicado en la síntesis de colágena en fases tempranas de la enfermedad (36,37,107).

En el presente estudio no se encontró diferencia significativa en la expresión del gen del TGF- β por fibroblastos de piel afectada de pacientes con EGP de larga evolución (> de 4 años) comparados con los sujetos controles. Posiblemente, la presencia del TGF- β al inicio de los síntomas de la enfermedad o al inicio de la fibrosis indica que este factor de crecimiento participa predominantemente en las fases tempranas de la enfermedad (75), lo cual no parece ocurrir en las fases tardías con la perpetuación de la fibrosis, como indican nuestros datos, obtenidos de pacientes con larga duración de la enfermedad.

Kawaguchi (3) demostró que los fibroblastos de pacientes con EGP de corta evolución (12 pacientes con menos de 1 año y un paciente con 5 años de evolución) expresaban constitutivamente los genes de la IL-1 alfa e IL-1 β , pero estos fibroblastos no fueron capaces de producir la proteína madura de la IL-1 β , la cual no se detectó en los

sobrenadantes de los cultivos de fibroblastos. Esto indicaría que la IL-1 β es regulada postranscripcionalmente y el autor sugiere que solamente la sobre expresión de la IL-1 α es de importancia en los fibroblastos de los pacientes con EGP. El mismo autor (134) demuestra la expresión aumentada del receptor de la IL-1 en fibroblastos de pacientes con EGP, por lo que, posiblemente, la IL-1 α actuaría también en forma autócrina. Nosotros solo demostramos la expresión de la IL-1 β en un paciente con CREST, lo que avalaría el papel poco relevante de la IL-1 β en los cambios locales observados en esta enfermedad. Posiblemente, la IL-1 β no actúa en forma autócrina en esta fase. Otras células, atraídas por citocinas producidas por el fibroblasto, son las que secretan la IL-1 β , y ésta a su vez ejerce sus acciones en forma parácrina.

En trabajos iniciales se ha demostrado que varias citocinas (IL-1, TNF- α , TGF- β , PDGF) influyen en la producción de colágena (24); el TGF- β ha demostrado ser el principal agente fibrogénico. Nuestros datos sugieren que el TGF- β no está implicado en la producción de colágena, por lo menos en pacientes de larga evolución. En ellos, la IL-6 es la principal responsable de la producción de colágena.

Los fibroblastos de pacientes con esclerodermia producen cantidades excesivas de colágenas tipo I, III, VI y VII (39,92,135). Diferentes líneas de investigación sugieren que estas proteínas son sintetizadas por subpoblaciones de fibroblastos (135), que son expandidas a través de la exposición de citocinas, ya sean autócrinas como el caso de la IL-6 y la IL-8, o parácrinas como el caso de la IL-1 β y, posiblemente, el TNF- α . En estudios previos, varios autores

han demostrado elevación concomitante de los niveles de ARNm de procolágenas tipo I y III, (determinados ya sea por Northern o dot-blot hibridación o por sondas de ADNc específico) con la biosíntesis aumentada de colágena de fibroblastos de pacientes con EGP. Nuestros datos confirman que la síntesis de colágena en monocapa de cultivo, por parte de los fibroblastos de pacientes con EGP de larga evolución, es significativamente mayor que en los sujetos controles ($p=0.028$).

Por último, encontramos correlación de la producción de colágena por los fibroblastos de pacientes con EGP con la expresión aumentada de los genes de IL-6 e IL-8 ($r_s=1$). Así, la IL-6 estaría jugando un papel muy importante en la síntesis de colágena por los fibroblastos de pacientes con EGP de larga evolución. Mientras que la IL-8 estaría atrayendo a diferentes células productoras de citocinas para actuar en forma parácrina y, asimismo, favorecería los mecanismos de adhesión celular, dando como resultado una regulación inmune local alterada.

IX. CONCLUSIONES

1.- Los cultivos de fibroblastos de pacientes con esclerosis generalizada de larga evolución (>4 años) expresan constitutivamente los genes de la IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α y del TGF- β , mientras que los sujetos controles expresan los genes de IL-6, IL-8, TNF- α y TGF- β .

2.- La expresión de los genes de IL-6 y de IL-8 en cultivos de fibroblastos de pacientes con esclerosis generalizada de larga evolución fue significativamente mayor que en los sujetos controles ($p=0,05$, $p<0.05$, respectivamente).

3.- No se detectó la expresión de los genes de la IL-2, IL-4, IL-10, IL-13 y de IFN- γ .

4.- La síntesis de colágena por los cultivos de fibroblastos de pacientes con EGP de larga evolución fue significativamente mayor que en los controles ($p=0.028$).

5.- Nuestros datos sugieren, que en la fase tardía de la EGP, la expresión del gen de la IL-6 podría jugar un papel importante en la producción de colágena.

6.- La cantidad de ADN total en los cultivos de fibroblastos fue similar en ambos grupos.

7.- Hubo correlación entre la expresión de IL-6 e IL-8 con la producción de colágena (1,2).

8.- la expresión constitutiva aumentada de los genes de la IL-6 y de la IL-8 puede jugar un papel importante en la perpetuación del trastorno de regulación inmune local, la activación de los fibroblastos y el mantenimiento de la lesión en estos pacientes.

X. BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Postlethwaite, A. E. Dermal fibroblast function. In: Dermal Immune System. Edited by Nickoloff, B. CRC Press. 1993. Boca Raton, USA. pp.163-184.
- 2.- Sumnerbell, D. Lewis, J.H. Walpert, T. Positional information in chick morphogenesis. *Nature*. 1973;244:492-494.
- 3.- Kawaguchi, Y. IL-1 α gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 1994;97:445-450.
- 4.- Van Snick, J. Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.* 1990;8:253-278.
- 5.- Feghali, C. Bost, K. Boulware, D. Levy, L. Mechanisms of pathogenesis in Scleroderma. I. Overproduction of interleukin 6 by fibroblast cultured from affected skin sites of patients with Scleroderma. *J. Rheumatol.* 1992;19:1207-1211.
- 6.- Van Damme, J. Opdenakker, G. Interaction of interferons with skin reactive cytokines from interleukin-1 to interleukin-8. *J. Invest. Dermatol.* 1990;95(Suppl.):S90-S95.
- 7.- Fibbe, W. Van Damme, J. Billiau, A. Duinkerken, N. Luruink, E. Ralph, P. Altrocks, B. Kaushansky, K. Willemze, R. Faulkenburg, J. Human fibroblasts produce granulocyte-CSF, macrophage-CSF, and granulocyte-macrophage-CSF following stimulation by interleukin-1 and poly(rI).poly(rC). *Blood*. 1988;72:860-866.

- 8.- Le, J. Weinstein, D. Gubler, U. Vilcek, J. Induction of membrane-associated interleukin-1 by tumor necrosis factor in human fibroblasts. *J. Immunol.* 1987;138:2137-2142.
- 9.- Larsen, C. Zachariae, C. O. Oppenheim, J.J. Marsushima, K. Production of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) by human dermal fibroblast in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989;160:1403-1409.
- 10.- Strieter, R. Phan, S. Showell, H. Remick, D. Lynch, J. Genord, M. Raiford, C. Eskandari, M. Marks, R. Kunkel, S. Monokine-induced neutrophil chemotactic factor gene expression in human fibroblast. *J. Biol. Chem.* 1989;264:10621-10627.
- 11.- Lawrence, D. Transforming growth factor- β : An overview. *Kidney Int.* 1995;47 (Suppl. 49) :S19-S23.
- 12.- Deuel, T. Polypeptide growth factors: roles in normal abnormal cell growth. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1987;3:443-449.
- 13.- Zurita Salinas, C. Palacios-Boix, A. Yáñez, A. González. F. Alcocer-Varela, J. Contamination with *Mycoplasma* spp. induces interleukin-13 expression by human skin fibroblasts in culture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1996. (Aceptado).
- 14.- Smith, E. Connective tissue metabolism including cytokines in scleroderma. *Current Opin. Rheum.* 1992;4:869-877.
- 15.- Korn, J. Piela-Smith, T. Interaction of immune and connective tissue cells. In: *Dermal Immune System*. Edited by Nickoloff, B. CRC Press. 1993. Boca Raton. USA. pp-185-208.

- 16.- Schmidt, J.A. Mizel, S.B. Cohen, D. Green, T. Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J. Immunol.* 1982;**128**:2177-2182.
- 17.- Raines, E.W. Dower, S.K. Ross, K. Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblast and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science.* 1989;**243**:393-395.
- 18.- Tingstrom, A. Reuterdaahl, C. Lindahl, P. Heldin, C-H. Rubin, K. Expression of the platelet-derived growth factor- β receptors on human fibroblasts. Regulation by recombinant platelet-derived growth factor-BB, IL-1, and tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* 1992;**148**:546-554.
- 19.- Vilcek, J. Palombella, V.J. Henrikksen-DeStefano, D. Swenson, C. Feinman, R. Hirai, M. Tsujimoto, M. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J. Exp. Med.* 1986;**163**:632-643.
- 20.- Monroe, J. Haldar, S. Prytowsky, M.B. Lammie, P. Lymphokine regulation of inflammatory processes:interleukin-4 stimulates fibroblast proliferation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1988;**49**:292-298.
- 21.- Postlethwaite, A. Early immune events in scleroderma. *Rheum. Dis. Clin. N.A.* 1990;**16**:125-139.
- 22.- Mignatti, P. Extracellular matrix by metalloproteinases and plasminogen activators. *Kidney Int.* 1995;**47**(Suppl. 49):S12-S14.
- 23.- Gay, S. Trabandt, A. Moreland, L. Gay, R. Growth factors, extracellular matrix, and oncogenes in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1992;**35**:304-310.

- 24.- Kovacs, E. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol. Today*. 1991;12:17-23.
- 25.- Holbrook, K. Smith, L. Morphology of connective tissue: Structure of the skin and tendon. In: *Connective Tissue and its Heritable Disorders*. Editors by Royce, P.M. Steinmann, B. Wiley-Liss, Inc. USA. 1993. pp.59.
- 26.- Raghov, R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J*. 1994;8:823-831.
- 27.- Jimenez, S. McArthur, W. Rosenbloom, J. Inhibition of collagen synthesis by mononuclear cell supernates. *J. Exp. Med*. 1979;150:1421-1429.
- 28.- Postlethwaite, A. Smith, G. Mainardi, C. Seyer, J. Kang, A. Lymphocyte modulation of fibroblast function *in vitro*: stimulation and inhibition of collagen production by different effector molecules. *J. Immunol*. 1984;132:2470-2477.
- 29.- Kahari, V. Heino, J. Vuorio, E. Interleukin-1 increases collagen production and mRNA levels in cultured skin fibroblast. *Biochim. Biophys. Acta*. 1987;929:142-148.
- 30.- Duncan, M. Berman, B. Differential regulation of collagen, glycosaminoglycans, fibronectin, and collagenase activity production in cultured human adult dermal fibroblast by interleukin-1 alpha and beta and tumor necrosis factor-alpha and beta. *J. Invest. Dermatol*. 1989;92:699-
- 31.- Douvas, A. Achten, M. Tan, E. Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J. Biol. Chem*. 1979;254:10514-10522.

- 32.- Tan, E. Rodman, G. Garcia, I. Moroi, Y. Fritzler, M. Peebles, C. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis: anticentromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum.* 1980;**23**:617-625.
- 33.- Okada, N. Menori, T. Mukai, R. Characterization of human autoantibodies that selectively precipitate the 7SL RNA component of the signal recognition particle. *J. Immunol.* 1987;**138**:3219-3223.
- 34.- Claman, H. Giorno, R. Seibold, J. Endothelial and Fibroblastic activation in Scleroderma. The Myth of the "Uninvolved skin". *Arthritis Rheum.* 1991;**34**:1495-1501.
- 35.- De Crombrughe, B. Vuorio, T. Karsenty, G. Control of type I collagen genes in scleroderma and normal fibroblasts. *Rheum. Dis. Clin. N.A.* 1990;**16**:109-123.
- 36.- Higley, H. Persichitte, K. Chu, S. Waegell, W. Vancheeswaran, R. Black, C. Immunocytochemical localization and serologic detection of transforming growth factor β 1. Association with type I procollagen and inflammatory cell markers in diffuse and limited systemic sclerosis, morphea, and Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum.* 1994;**37**:278-288.
- 37.- Mauch, C. Eckes, B. Hubzelmann, N. Oono, T. Kozłowska, E. Krieg, T. Control of fibrosis in Systemic Scleroderma. *J. Invest. Dermatol.* 1993;**100**:92S-96S.
- 38.- Burgeson, R.E. Type VII collagen anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* 1993;**101**:252-255.

- 39.- Rudnicka, L. Varga, J. Christiano, A. Iozzo, R. Jimenez, S. A. Uitto, J. Elevated expression of type VII collagen in the skin of patients with Systemic Sclerosis. *J. Clin. Invest.* 1994;**93**:1709-1715.
- 40.- Overall, C. Wrana, J. Sodek, J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblast. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* 1991;**266**:14064-
- 41.- Van der Rest, M. Garrone, R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991;**5**:2814-2823.
- 42.- Vuorio, E. de Combrugghe, B. The family of collagen genes. *Annu. Rev. Biochem.* 1990;**59**:837-872.
- 43.- Mauviel, A. Lapiere, J.Ch. Halcin, C. Evans, Ch. Uitto, J. Differential cytokine regulation of type and type VII collagen gene expression in cultured human dermal fibroblast. *J. Biol. Chem.* 1994;**269**:25-28.
- 44.- Brenner, D. Rippe, R. Rhodes, K. Trotter, J. Breindl, M. Fibrogenesis and type I collagen gene regulation. *J. Lab. Clin. Med.* 1994;**124**:755-760.
- 45.- Jiménez, S. A. Feldman, G. Bashey, R.I. Bienkowski, R. Rosenbloom, J. Co-ordinate increase in the expression of type I and type III collagen genes in Progressive Systemic Sclerosis fibroblasts. *Biochem. J.* 1986;**237**:837-843.
- 46.- Galéra, P. Musso, M. Park, R. Karsentry. c-Krox: a new transcription regulator of type I collagen genes preferentially expressed in skin. *Matrix Biol.* 1994;**14**:368 (abstract).

- 47.- Zhang, R.-Z. Pan, T. C. Sokes, D. Chu, M.-L. Characterization of the human $\alpha 1(\text{VI})$ collagen gene promoter. *Matrix Biol.* 1994;14:372 (abstract).
- 48.- Haralson, M.A. Goins, R.A. DiMari, S.J. Harris, R.C. TGF β differentially regulates type IV and type I collagen synthesis in rabbit proximal tubule cells. *Matrix Biol.* 1994;14:374-375 (abstract).
- 49.- Needleman, B. W. Wigley, F. Stair, R. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor α , and interferon- γ levels in sera from patients with Scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1992;35:67-72.
- 50.- Needleman, B.W. Immunologic aspects of scleroderma. *Current Opin. Rheum.* 1994;6:612-615.
- 51.- Postlethwaite, A. Connective tissue metabolism including cytokines in scleroderma. *Current. Opin. Immunol.* 1994;6:616-620.
- 52.- Ferrarini, M. Steen, V. Medsger, T. A. Whiteside, T.L. Functional and phenotypic analysis of T lymphocytes cloned from the skin of patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 1990;79:346-352.
- 53.- Kantor, T. Friberg, D. Medsger, T. Buckingham, R. Whiteside, T. Cytokine production and serum levels in systemic sclerosis. *Clin. Immunol. Immunopath.* 1992;65:278-285.
- 54.- Takemura, H. Suzuki, H. Yoshizaki, K. Ogata, A. Yuhara, T. Akama, T. Yamane, K. Kashiwagi, H. Anti-interleukin-6 autoantibodies in rheumatic diseases. Increased frequency in the sera of patients with Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1992;35:940-943.

- 55.- Reitamo, S. Remitz, A. Tamai, K. Vitto, J. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 1994;94:2489-2492.
- 56.- Villarreal, GM. Llorente, L. Alcocer-Varela. Expresión diferencial in vivo de los genes de interleucina (IL)-10 e IL-13 en glándulas salivales (GS) y sangre periférica (SP) de pacientes con síndrome de Sjögren Primario (SSP). *Rev. Mex. Reumatol.* 1996;11 (supl.1):1 (resumen).
- 57.- Kovacs, E. DiPietro, L.A. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 1994;8:854-861.
- 58.- Dinarello, C.A. Wolff, S.M. The role of interleukin-1 in disease. *N. Engl. J. Med.* 1993;328:106-113.
- 59.- Freundlich, B. Bomalaski, J. Neilson, E. Jiménez, S. A. Regulation of fibroblast proliferation and collagen synthesis by cytokines. *Immunol. Today.* 1986;7:303-307.
- 60.- Kahaleh, M. B. Vascular disease in scleroderma. Endothelial T lymphocyte-fibroblast interactions. *Rheum. Dis. Clin. N.A.* 1990;16:53-73.
- 61.- Boumpas, D. Tsokos, G. Pathophysiologic aspects of lymphokines. *Clin. Immunol. Rev.* 1985;4:201-240.
- 62.- Paul, W. Interleukin-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood.* 1991;77:1859-1870.
- 63.- Postlethwaite, A. Katai, H. Raghov, R. Stimulation of extracellular matrix biosynthesis in fibroblasts by interleukin-4. *Arthritis Rheum.* 1989;32(suppl.):B167 (abstract).

- 64.- Duncan, M. Berman, B. Stimulation of collagen and glycosaminoglycans production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *J. Invest. Dermatol.* 1991;**97**:686-692.
- 65.- Yoshimura, T. Matsushima, K. Tanaka, S. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to the other host defense cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1987;**84**:9233-9237.
- 66.- Reitamo, S. Remitz, A. Varga, J. Ceska, M. Effenberger, F. Jimenez, S. Uitto, J. Demonstration on interleukin 8 and autoantibodies to interleukin 8 in the serum of patients with Systemic Sclerosis and related disorders. *Arch. Dermatol.* 1993.**129**:189-193.
- 67.- Fiorentino, D. Bond, M. Mosmann, T. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 1989;**170**:2081-2095.
- 68.- Zurawski, G. de Vries, J.E. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol. Today.* 1994;**19**:19-26.
- 69.- Solis-Herruzo, J. Brenner, D. Chojkier, M. Tumor necrosis factor alfa inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1988;**263**:5841-5848.
- 70.- Vilcek, J. Palombella, V. Henriksen-Destafano, D. Swenson, C. Feinman, R. Itirai, M. Tsujimoto, M. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J. Exp. Med.* 1986;**163**:632-640.

- 71.- Roberts, A. Sporn, M. Assoian, R. Smith, J. Roche, N. Wakefield, L. Heine, U. Liotta, L. Falanga, V. Kehrl, J. Fauci, A. Transforming growth factor type β : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986;83:4167-4171.
- 72.- Xu, W. Leroy, E.C. Smith, E. Fibronectin release by systemic sclerosis and normal dermal fibroblast in response to TGF- β . *J. Rheumatol.* 1991;18:241-246.
- 73.- Rosenbloom, J. Feldman, G. Freundlich, B. Jimenez, S. Inhibition of excessive scleroderma fibroblast collagen production by recombinant gamma-interferon. *Arthritis Rheum.* 1986;29:851-856.
- 74.- Korn, J. Black, C. The second International Workshop on scleroderma research. *Matrix.* 1993;13:427-429.
- 75.- Gabrielli, A. Di Loreto, C. Taborra, R. Candela, M. Sambo, P. Nitti, C. Danieli, M.G. DeIustro, F. Dasch, J. Danieli, G. Immunohistochemical localization of intracellular and extracellular associated TGF β in the skin of patients with systemic sclerosis (Scleroderma) and primary Raynaud's phenomenon. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1993;68:340-349.
- 76.- Perez, M. I. Kohn, S. R. Systemic sclerosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1993;28:525-547.
- 77.- Walder, B.K. Do solvents cause scleroderma? *Int. J. Dermatol.* 1983;22:157-158.
- 78.- Veltman, C. Lange, C.E. Juke, S. Clinical manifestations and course of vinyl chloride disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1975;246:6-17.

- 79.- LeRoy, E.C. A brief overview of the pathogenesis of scleroderma (systemic sclerosis). *Ann. Rheum. Dis.* 1992;**51**:286-288.
- 80.- Black, C. The aetiopathogenesis of systemic sclerosis. *J. Int. Med.* 1993;**234**:3-8.
- 81.- Cambell, P. LeRoy, C. Systemic sclerosis: a vascular hypothesis. *Semin. Arthritis Rheum.* 1975;**4**:351-368.
- 82.- Claman, H. Mast cells and fibrosis. The relevance to scleroderma. *Rheum. Dis. Clin. N.A.* 1990;**16**:141-151.
- 83.- Claman, H. On scleroderma: mast cells, endothelial cells, and fibroblasts. *JAMA.* 1989;**262**:1206-1209.
- 84.- Kawaguchi, Y. Harigai, M. Kitani, A. Suzuki, K. Kawakami, M. Ishizuka, T. Hidaka, T. Hara, M. Kawagoe, M. Nakamura, H. Effect of prolyl 4-hydroxylase inhibitor on fibroblast collagen production *in vitro*: an approach to the treatment of Systemic Sclerosis. *J. Rheumatol.* 1992;**19**:1710-1715.
- 85.- Whiteside, T. L. Ferrarini, M. Hebda, P. Buckingham, R. B. Heterogeneous synthetic phenotype of cloned scleroderma fibroblasts may be due to aberrant regulation in the synthesis of connective tissue. *Arthritis Rheum.* 1988;**31**:1195-1229.
- 86.- Vuorio, T. Kähäri, V-M. Black, C. Vuorio, E. Expression of osteonectin, decorin, and transforming growth factor- β 1 genes in fibroblast cultured from patients with systemic sclerosis and morphea. *J. Rheumatol.* 1991;**18**:247-251.
- 87.- Basey, R.I. Perlish, J.S. Nochumson, S. Stephens, R.E. Fleischmajer, R. Connective tissue synthesis by cultured scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 1977;**20**:879-885.

- 88.- Vuorio, T.K. Kähäri, V-M. Lehtonen, A. Vuorio, E. Fibroblast activation in scleroderma. *Scand. J. Rheumatol.* 1984;**13**:229-237.
- 89.- Kawaguchi, Y. Kitani, A. Hara, M. Harigai, M. Hirose, T. Suzuki, K. Kawakami, M. Hidaka, T. Ishizuka, T. Kawagoe, M. Nakamura, H. Cytokine regulation of prolyl 4-hydroxylase production in skin fibroblast cultures from patients with Systemic Sclerosis: Contribution to collagen synthesis and fibrosis. *J. Rheumatol.* 1992;**19**:1195-1201.
- 90.- Needleman, B. W. Choi, J. Burrows-Mezu, A. Fontana, J. Secretion and binding of transforming growth factor β 1 by scleroderma and normal dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 1990;**33**:650-656.
- 91.- Peltonen, J. Kähäri, L. Jaakkola, S. Kähäri, VM, Varga, J. Uitto, J. Jimenez, S. Evaluation of transforming growth factor β and type I procollagen gene expression in fibrotic skin disease by in situ hybridization. *J. Invest. Dermatol.* 1990;**94**:365-371.
- 92.- Peltonen, J. Kähäri, L. Uitto, J. Jimenez, S. Increased expression of type VI collagen genes in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1990;**33**:1829-1835.
- 93.- Varga, J. Jimenez, S. Modulation of collagen gene expression: its relation to fibrosis in systemic sclerosis and other disorders. *Ann. Intern. Med.* 1995;**122**:60-62.
- 94.- González-Amaro, R. Alarcón-Segovia, D. Alcocer-Varela, J. Díaz de León, L. Rosenstein, Y. Mononuclear cell-Fibroblast interactions in Scleroderma. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1988;**46**:412-420.
- 95.- Sfikakis, P. McCune, B. Tsokos, M. Aroni, K. Vayiopoulos, G. Tsokos, G. Immunohistological demonstration of transforming growth

- factor B isoforms in the skin of patients with systemic sclerosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1993;69:199-204.
- 96.- Fleischmajer, R. Perlish, J. Reeves, J. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis Rheum.* 1977;20:975-984.
- 97.- Carvalho, D. Savage, C. Black, C. Pearson, J. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J. Clin. Invest.* 1996;97:111-119.
- 98.- Wigley, F. Clinical aspects of systemic and localized scleroderma. *Current Opin. Rheum.* 1994;6:628-636.
- 99.- Steen, V. Powell, D. Medsger, T. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:196-203.
- 100.- Pollard, K. Reimer, G. Tan, E. Autoantibodies in scleroderma. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1989;17:271-283.
- 101.- Nishikai, M. Itoh, K. Sato, A. Calcinosis and the anticentromere antibody: its clinical, radiological and immunogenetic aspects. *Br. J. Rheumatol.* 1992;31:9-12.
- 102.- LeRoy, C. Black, C. Fleischmajer, R. Jablonska, S. Krieg, T. Medsger, T. Rowell, N. Wollheim, F. Scleroderma (Systemic Sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol.* 1988;15:202-205.
- 103.- Kurzhals, G. Meurer, M. Krieg, T. Clinical association of autoantibodies to fibrillarin with diffuse scleroderma and disseminated telangiectasia. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1990;23:832-836.

- 104.- Suzuki, H. Takemura, H. Yoshizaki, K. Koishihara, Y. Ohnogi, Y. Okano, A. Akiyama, Y. Tojo, T. Kishimoto, T. Kashiwagi, H. IL-6-anti-IL-6 autoantibody complexes with IL-6 activity in sera from some patients with systemic sclerosis. *J. Immunol.* 1994;**152**:935-942.
- 105.- Black, C.M. Welsh, K.I. Maddison, P.J. Jayson, M.W. Bernstein, R. M. HLA antigens, autoantibodies and clinical subsets in Scleroderma. *Br. J. Rheumatol.* 1984;**23**:267-271.
- 106.- Briggs, D. Black, C. Welsh, K. Genetic factors in Scleroderma. *Rheum. Dis. Clin. N.A.* 1990;**16**:31-51.
- 107.- Luderschmidt, Ch. Scholz, S. Mehlhaff, E. König, G. Albert, E. Association of Progressive Systemic Scleroderma to several HLA-B and HLA-DR alleles. *Arch. Dermatol.* 1987;**123**:1188-1191.
- 108.- Vargas-Alarcón, G. Granados, J. Ibañez de Kasep, G. Alcocer-Varela, J. Alarcón-Segovia, D. Association of HLA-DR5 (DR11) with systemic sclerosis (Scleroderma) in Mexican patients. *Clin. Exp. Immunol.* 1995;**13**:11-16.
- 109.- Reveille, J. Owerbach, D. Goldstein, R. Moreda, R. Isern, R. Arnett, F. Association of polar amino acids at position 26 of the HLA-DQB1 first domain with the anticentromere autoantibodies response in Systemic Sclerosis (Scleroderma). *J. Clin. Invest.* 1992;**89**:1208-1213.
- 110.- Kulozik, M. Hogg, A. Lankat-Buttgereit, B. Krieg, T. Co-localization of transforming growth factor β 2 with α 1(I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *J. Clin. Invest.* 1990;**86**:917-922.

- 111.- Kahelah, M.B. LeRoy, E. C. Interleukin-2 in Scleroderma: Correlation of serum level with extent of skin involvement and disease duration. *Ann. Intern. Med.* 1989;110:446-450.
- 112.- Feghali, C. Boulware, D. Levy, L. Mechanisms of pathogenesis in Scleroderma. II. Effects of serum and conditioned culture medium on fibroblast function in Scleroderma. *J. Rheumatol.* 1992;19:1212-1219.
- 113.- Lupoli, A. McWhirter, A. Plater-Zyberk, C. Piela, T.H. Korn, J.H. Olsen, I. Black, C. Expression and function of surface antigens on scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 1991;34:1164-1172.
- 114.- Raghov, R. Postlethwaite, A. Keski-Oja, J. Moses, H. Kang, A. Transforming growth factor- β increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin mRNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 1987;79:1285-1288.
- 115.- Alcocer-Varela, J. Laffón, A. Alarcón-Segovia, D. Differences in the production of and/or the response to interleukin-2 by T lymphocytes from patients with the various connective tissue diseases. *Rheumatol. Int.* 1984;4:39-44.
- 116.- Alcocer-Varela, J. Martínez-Cordero, E. Alarcón-Segovia, D. Spontaneous production of, and defective response to, interleukin-1 by peripheral blood mononuclear cells from patients with scleroderma. *Clin. Exp. Immunol.* 1985;59:666-672.
- 117.- Alarcón-Segovia, D. Alcocer-Varela, J. Probable role of interleukin-1 in the pathogenesis of scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1985;28:1316-1317. (letter).

- 118.- Unehara, H. Kumagai, S. Ishida, H. Suginoshita, T. Maeda, M. Imura, H. Enhanced production of interleukin-2 in patients with progressive systemic sclerosis. Hyperactivity of CD4-positive T cells?. *Arthritis & Rheum.* 1988;**31**:401-407.
- 119.- Whiteside, T. L. Worrall, J.G. Prince, R. K. Buckingham, R. B. Rodnan, G. P. Soluble mediators from mononuclear cells increase the synthesis of glycosaminoglycan by dermal fibroblast cultures derived from normal subjects and progressive systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum.* 1985;**28**:188-197.
- 120.- Subcommittee for scleroderma criteria of the american rheumatism association diagnostic and therapeutic criteria committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 1980;**23**:581-590.
- 121.- Diegelmann, R. Graham, M. Bryson, G. An in Vitro microassay to quantitate collagen synthesis and its utility for analyzing the effects of defined inflammatory mediators. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990;**580**:514-5177.
- 122.- Diegelmann, R. Peterkofsky, B. Inhibition of collagen secretion from bone and cultured fibroblast by microtubular disruptive drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1972;**69**:892-896.
- 123.- Labarca, C. Paigen, K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 1980;**102**:344-352.
- 124.- Bruns, M. Herrmann, K. Haustein, U-F. Immunologic parameters in systemic sclerosis. *Int. J. Dermatol.* 1994;**33**:25-32.
- 125.- Duncan, M. Berman, B. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal

- fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *J. Invest. Dermatol.* 1991;**97**:686-692.
- 126.- Koch, A. Kronfeld-Harrington, L. Szekanecz, Z. Cho, M. Haines, G. Harlow, L. Strieter, R. Kunkel, S. Massa, M. Barr, W. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. *Pathobiology.* 1993;**61**:239-246.
- 127.- Silver, R. M. Interstitial lung disease of systemic sclerosis. *Int. Rev. Immunol.* 1995;**12**:281-291.
- 128.- Westermarck, J. Hakkinen, L. Fiers, W. Kahari, V.M. TNF-R55-specific form of human tumor necrosis factor-alpha induces collagenase gene expression by human skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 1995;**105**:197-202.
- 129.- Takeda, K. Hatamochi, A. Arakawa, M. Ueki, H. Effects of tumor necrosis factor-alpha on connective tissue metabolism in normal and scleroderma fibroblast cultures. *Arch. Dermatol. Res.* 1993;**248**:440-444.
- 130.- LeRoy, C. Smith, E. Kahaleh, B. Trojanowska, M. Silver, R. A strategy for determining the pathogenesis of systemic sclerosis. Is transforming growth factor β the answer? *Arthritis Rheum.* 1989;**32**:817-825.
- 131.- Smith, E. LeRoy, C. A possible role for transforming growth factor- β in systemic sclerosis. *J. Invest. Dermatol.* 1990;**95**:
- 132.- McWhirter, A. Colosetti, P. Rubin, K. Miyazono, K. Black, C. Collagen type I is not under autocrine control by transforming growth factor- β 1 in normal and scleroderma fibroblasts. *Lab. Invest.* 1994;**71**:885-894.

133.- Gruschwitz, M. Müller, P. Sepp, N. Hofer, E. Pontana, A. Wick, G. Transcription and expression of transforming growth factor type beta in the skin of progressive systemic sclerosis: A mediator of fibrosis? *J. Invest. Dermatol.* 1990;**94**:197-203.

134.- Kawaguchi, Y. Harigai, M. Hara, M. Suzuki, K. Kawakami, M. Ishizuka, T. Hidaka, T. Kitani, A. Kawagoe, M. Nakamura, H. Increased interleukin 1 receptor, type I, at messenger RNA and protein level in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992;**184**:1504-1510.

135.- Needleman, B.W. Ordonez, J. Taramelli, D. Alms, W. Gayer, K. Choi, J. In vitro identification of a subpopulation of fibroblasts that produces high levels of collagen in scleroderma patients. *Arthritis Rheum.* 1990;**33**:842-852.

XI. AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Luis Llorente-Peters.

Al Dr. Jorge Alcocer-Varela.

A la QFB Ivonne Richaud-Patin.

Al MC Edgar Kröttsch-Gómez.

Al Dr. Rafael Ariza-Ariza.

A la MC Gilda Villarreal.

Al Dr. Julio Granados A.

Al Dr. Lino Díaz de León.

Al Dr. Alberto Palacios-Boix.

A la Dra. Mayra Cifuentes.

Al personal del Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

A la Secretaría de Relaciones Exteriores de México.